

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
II**



TESIS DOCTORAL

**Expresión génica diferencial de la vía WNT y de
moléculas de adhesión y matriz extracelular en cáncer
colorrectal esporádico con y sin inestabilidad en
microsatélites**

TESIS DOCTORAL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Paloma Ortega Esteban

Directores:

Pilar Iniesta
Manuel Benito de las Heras
Alberto Morán Millán

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-7727-7

© Paloma Ortega Esteban, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
II**



TESIS DOCTORAL

**EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE LA VÍA WNT Y DE
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y MATRIZ EXTRACELULAR EN
CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO CON Y SIN
INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

PALOMA ORTEGA ESTEBAN

Directores:

**Pilar Iniesta
Manuel Benito de las Heras
Alberto Morán Millán**

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-7727-7

© Paloma Ortega Esteban, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II



**EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE LA VÍA WNT Y DE MOLÉCULAS DE
ADHESIÓN Y MATRIZ EXTRACELULAR EN CÁNCER COLORRECTAL
ESPORÁDICO CON Y SIN INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES**

TESIS DOCTORAL

PALOMA ORTEGA ESTEBAN

Madrid, 2010

**EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE LA VÍA WNT Y DE MOLÉCULAS DE
ADHESIÓN Y MATRIZ EXTRACELULAR EN CÁNCER COLORRECTAL
ESPORÁDICO CON Y SIN INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES**



El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Paloma Ortega Esteban, bajo la dirección de Pilar Iniesta, Manuel Benito de las Heras y Alberto Morán Millán en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia

Opta al grado de Doctor

Paloma Ortega Esteban

AGRADECIMIENTOS

El momento de dar las gracias es para mí, uno de los más deseados, porque me brinda la oportunidad de demostrar el agradecimiento a todos los que han formado parte de todo esto. En primer lugar quería agradecer a Pilar Iniesta y a Manuel Benito por acogerme en el proyecto y, junto con Alberto, haber hecho que esta Tesis haya sido posible. Por supuesto a todos los integrantes del laboratorio 36 con los que he compartido todo este tiempo y trabajo. Gracias a los Servicios de Cirugía 2, Anatomía Patológica y al Laboratorio de Oncología del Hospital Clínico San Carlos y al Dr. Santiago Ramón y Cajal por su colaboración. Asimismo, extendiendo mis agradecimientos a los pacientes de cáncer colorrectal por su cooperación desinteresada en este estudio.

No puedo evitar retrasar más el momento de dar las gracias a Cris y a Antonio. Chicos, supongo que lo habré dicho más de una vez, pero sin vuestro apoyo, sin vuestras risas, sin vuestra amistad, NADA habría sido igual. Cris, tú ya sabes todo lo que hemos vivido juntas, lo bueno y lo malo, no lo cambiaría jamás. Antonio, siempre me has demostrado que todo es posible, gracias por tu ánimo incondicional. Sois parte de este trabajo y de mí, nunca os olvidaré.

Alberto, por tu ayuda, tiempo y paciencia, gracias por estar siempre para mí, incluso en mis ataques de nerviosismo. Al final conseguimos equilibrarnos el uno al otro. Óscar, por involucrarte tanto y tener siempre la solución a todo con la mejor de las sonrisas, gracias por ser como eres. Almu, por tu sinceridad e integridad, eres todo un ejemplo. Yoli, mi chica de carácter con corazón de oro, gracias por todo. Álvaro, envidiable compañero, siempre dispuesto a enseñar y echarme una mano, y además el mejor en las fiestas, mil gracias. Rocío, ¿alguien puede ser más bueno y humilde que tú?, gracias por ayudarme a sacar lo bueno de las cosas. Dora, ¡que no me olvido de ti!, estoy convencida de que aunque “vengamos a sufrir”, siempre hay momentos buenos... gracias por brindarme algunos de ellos.

Rebe, tu sencillez y simpatía son indispensables en el día a día. María, gracias por demostrarme lo fuerte que es la voluntad de una persona. Gemma y Silvia gracias por contar siempre conmigo. Bea, siempre con algún pequeño recurso para ayudarte, gracias. Ami, con su Colombia por bandera, gracias por tus vivencias y pensamientos en voz alta, ha sido interesante y divertido conocerte. Tamara, gracias por esos pocillos “salvadores” de cuantitativa. A Carlos y Alberto, una pareja inseparable, gracias por vuestra colaboración. Javier, por tu legado y tu pasión en el trabajo, gracias. Carmencita, tampoco he olvidado tu

AGRADECIMIENTOS

generosidad, muchísimas gracias. Julia, Valeria, Nati, Noemí, Direna, y nuestras chicas nuevas... ¡gracias!

Gracias a María, Lucía, Iria, Sonia, Rocío (¡¡ay nuestra FPU!!), Ana y Loa, que aunque me pilléis lejos en el pasillo, siempre se os tiene presentes, que buenas risas nos hemos echado también juntas. Por supuesto, agradezco al resto de compañeros, Elisa, Laura, Juan, Esther, y profesores que forman el departamento, por las vivencias del día a día.

Gracias especiales al profesor Trevor Dale por aceptarme en su laboratorio y brindarme la oportunidad de aprender un poquito más del mundo de la ciencia, y a Liz, por su dedicación durante esos tres meses.

Pero una Tesis va más allá de las paredes de un laboratorio. Quiero agradecer a mi familia, su confianza en mí y mis posibilidades me lleva acompañando muchos años, y esto no es más que otro pequeño logro más que me han ayudado a conseguir. Gracias por tener tanta fe en mí. Óscar, sabes que eres increíble. Gracias por aguantar tanto y siempre darme lo que necesitaba, una sonrisa, un abrazo, tu presencia e interés, gracias de corazón.

A mi amiga Marta, “si nosotras no podemos, ¿quién va a poder?”... ¿te acuerdas?, gracias por enseñarme a superarme. Gustavo, por darme esa amistad que solo saben dar los que han nacido “en fechas tan señaladas”. Felipe, siempre tan involucrado, gracias por tu interés. María, Emilie, y Francesca gracias por vuestra amistad durante estos años. María y Sergio, ha sido una gran suerte conoceros, gracias por darme tanto sin yo pedirlo y siempre estar disponibles para mí. Victoria, Carmen, Handry... gracias por nuestros fines de semana, hicisteis de ellos una diversión y no una obligación. A Sebastian, Jonny y Amal, por aceptarme y abrirme vuestras vidas. Martin, gracias por haber compartido conmigo tanto tiempo y enseñarme a sonreír de nuevo, fuiste una salvación. A Lutz, por haberme brindado tu confianza y siempre darme consejo, gracias por tu ánimo.

Después de todo lo que me habéis dado cada uno de vosotros, solo puedo daros todo mi agradecimiento. En resumen, vosotros ya sabéis que este trabajo es de todos. GRACIAS.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
I. I MMP-2 Y MMP-9	3
I. II MMP-3	4
I. III E-CADHERINA	5
II. OBJETIVOS	6
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	7
A. CÁNCER COLORRECTAL	9
A. 1 CLASIFICACIÓN TUMORIGÉNICA	10
A. 2 CÁNCER HEREDITARIO Y ESPORÁDICO	11
A.2.1 CÁNCER HEREDITARIO	11
A.2.1.1 FAP	12
A.2.1.2 HNPCC	13
A.2.2 CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO	14
A.2.2.1 Vía Supresora	14
A.2.2.2 Vía del fenotipo mutador	15
B. VÍA WNT	20
B.1 VÍA WNT CANÓNICA	20
B.1.1 Los ligandos: la familia WNT y sus inhibidores	21
B.1.2 Los receptores de la vía WNT: procesos de regulación a nivel de membrana	22
B.1.3 El complejo de degradación de β -catenina	26
B.1.4 En el núcleo: activación transcripcional de β -catenina	33
B.2 VÍA WNT NO CANÓNICA	37
B.2 WNT Y CÁNCER	39
C. E-CADHERINA Y VÍA WNT	41
D. METALOPROTEASAS Y MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR	44

D.1 METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR.....	44
D.1.1 MMPs: Implicación en cáncer.....	47
D.2 INTEGRINAS.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. MUESTRAS TISULARES.....	55
2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN Y ADN	56
2.1 EXTRACCIÓN DE ARN.....	56
2.1.2 Purificación del ARN.....	57
2.2 EXTRACCIÓN DEL ADN.....	58
3. ESTUDIO DE INESTABILIDAD EN SECUENCIAS MICROSATÉLITES	59
4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MATRICES DE OLIGONUCLEÓTIDOS	63
4.1 CALIDAD DEL ARN Y SÍNTESIS DEL ADNc.....	67
4.2 SÍNTESIS, MARCAJE Y AMPLIFICACIÓN DE ARNc.....	68
4.3 PURIFICACIÓN DE ARNc	69
4.4 HIBRIDACIÓN	69
4.5 LAVADOS	70
4.6 DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE	70
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	71
5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	72
5.1 SÍNTESIS DEL ADNc.....	74
5.2 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	76
5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
5.3.1 Análisis estadístico para los valores de expresión de genes de la vía WNT y relacionados con MMPs/adhesión por PCR cuantitativa respecto a la agrupación de tumores con y sin inestabilidad en microsatélites.....	77
5.3.2 Análisis estadístico para los valores de expresión de genes de la vía WNT y relacionados con MMPs/adhesión por PCR cuantitativa respecto a los datos clínicos..	78
6. SECUENCIACIÓN DE LAS SECUENCIAS MICROSATÉLITE DEL PROMOTOR DE <i>MMP-7</i>	78

6.1 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DE LA PCR DEL PROMOTOR DE <i>MMP-7</i>	80
7. CULTIVOS CELULARES.....	81
7.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.....	82
7.1.1 Extracción de ARN de cultivos celulares	83
7.1.2. Nivel de expresión de los genes seleccionados mediante PCR cuantitativa a tiempo real.....	83
8. ENSAYOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO	83
8.1 TRANSFORMACIÓN DE LAS BACTERIAS.....	86
8.1.1 Comprobación de la transformación bacteriana	87
8.2 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO	88
8.3 TRANSFECCIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES	89
8.3.1 Transfección por electroporación (<i>Amaxa</i> [®])	90
8.3.2 Transfección por liposomas catiónicos	90
8.3.2.1 Lipofectamine [™] 2000 Reagent (Invitrogen)	90
8.3.2.2 FuGene [®] HD Transfection Reagent (Roche).....	91
8.3.3 Transfección con nanopartículas asistidas por imán (<i>MA Lipofection</i> [®] Enhancer) 91	
8.4 COMPROBACIÓN DEL GRADO DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA VÍA WNT TRATADOS CON <i>shRNA</i>	92
8.4.1 Nivel de silenciamiento de los genes tratados con <i>shRNA</i> en cultivo celular mediante PCR cuantitativa tiempo real	92
9. ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA WNT CON WNT3a EN LÍNEAS CELULARES TRANSFECTADAS CON <i>shRNA</i> : <i>TCF REPORTER ASSAY</i>	92
9.1 PROTOCOLO DE TRANSFECCIÓN PARA EL <i>TCF REPORTER ASSAY</i>	95
9.2 ESTÍMULO CON WNT3a SOBRE CÉLULAS TRANSFECTADAS CON <i>TCF REPORTER</i>	97
9.3 LECTURA DE LA EXPRESIÓN DE <i>LUCIFERASE</i> DEL <i>TCF REPORTER ASSAY</i> EN RESPUESTA AL ESTÍMULO CON LA PROTEÍNA WNT3a RECOMBINANTE HUMANA	98
9.4 ANÁLISIS DE LA LECTURA DE LUMINISCENCIA DE <i>LUCIFERASA</i>	99
9.4.1 Análisis estadístico del ensayo <i>TCF Reporter</i>	100
RESULTADOS	101

1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE TUMORES COLORRECTALES OBJETO DE ESTUDIO..	103
2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA VÍA WNT.....	104
2.1 ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA VÍA WNT MEDIANTE EL USO DE MATRICES DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	104
2. 2 ANÁLISIS DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES RELACIONADOS CON LA VÍA WNT POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	112
2.2.1 Análisis de los datos de expresión en tumores colorrectales MSI-H y MSI-L/MSS	112
2.2.2 Análisis de los datos de expresión con relación a las características clínicas de los tumores MSI-L/MSS	119
3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON ADHESIÓN CELULAR Y MATRIZ EXTRACELULAR.....	127
3.1 ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN ADHESIÓN Y MATRIZ EXTRACELULAR CON MATRICES DE OLIGONUCLEÓTIDOS	127
3.2 ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN ADHESIÓN Y MATRIZ EXTRACELULAR POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.....	133
3.2.1 Análisis de los datos de expresión de los genes de adhesión y matriz extracelular en tumores MSI-H y MSI-L/MSS.....	133
3.2.2 Estudio de la relación de los datos de expresión y las características clínicas en los tumores MSI-L/MSS	137
4. ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS MICROSATÉLITE DEL PROMOTOR DE <i>MMP-7</i>	142
5. ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO: ACTIVACIÓN DE LA VÍA WNT CON WNT3a EN LÍNEAS CELULARES TRANSFECTADAS CON <i>shRNA</i> (<i>TCF REPORTER ASSAY</i>).....	144
5.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES MSI-H Y MSI-L/MSS	144
5.2 ENSAYO <i>TCF REPORTER</i> TRAS LA INHIBICIÓN DE <i>PPP2R1B</i> EN LA LÍNEA CELULAR RKO	146
5.3 ENSAYO <i>TCF REPORTER</i> TRAS LA INHIBICIÓN DE <i>FBXW4</i> EN LA LÍNEA CELULAR RKO	147
5.4 ENSAYO <i>TCF REPORTER</i> TRAS LA INHIBICIÓN DE <i>DVL2</i> EN LA LÍNEA CELULAR RKO ..	148
DISCUSIÓN.....	151
1. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS CON LA VÍA WNT EN CÁNCERES COLORRECTALES MSI-H Y MSI-L/MSS	154
1.1 Caseína quinasa Id.....	155

1.2 Isoforma β de la subunidad A de la fosfatasa PP2A	157
1.3 Transducin-like enhancer of Split 3	161
1.4 F-box and WD repeat domain containing 4	163
1.5 Dishevelled 2	165
1.6 Kremen 2	167
1.7 WNT Inhibitor Factor 1	169
2. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS CON MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR Y MATRIZ EXTRACELULAR EN TUMORES COLORRECTALES MSI-H Y MSI-L/MSS...	170
2.1 Sarcoglicano ϵ	170
2.2 Metaloproteasa de matriz extracelular 7.....	171
CONCLUSIONES	173
BIBLIOGRAFÍA.....	177

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Nuestro grupo de investigación se ha centrado, en los últimos años, en el estudio de posibles diferencias moleculares que permitan explicar las distintas características clinicopatológicas de los cánceres colorrectales (CRCs) de la vía del fenotipo mutador y de la vía supresora. Estas patologías también son conocidas, respectivamente, como cánceres con alta inestabilidad en microsatélites (*MicroSatellite Instability-High*, MSI-H) y cánceres de baja o nula inestabilidad en microsatélites (*MicroSatellite Instability-Low*, MSI-L y *MicroSatellite Stable*, MSS).

A continuación, a modo de introducción al trabajo realizado en esta Tesis Doctoral, se resumen los principales resultados obtenidos previamente por nuestro grupo, acerca del tema objeto de investigación.

I.1 MMP-2 Y MMP-9

Dentro del estudio de diferencias moleculares existentes entre las dos vías carcinogénicas, y teniendo en cuenta su diferente grado de agresividad, nuestro grupo planteó el estudio de MMP-2 y MMP-9, también denominadas gelatinasas A y B. Se trata de dos de las metaloproteasas (*Matrix MetalloProteinases*, MMPs) más destacadas por su implicación en la transformación tumoral, así como en la infiltración en vasos sanguíneos y linfáticos, permitiendo la metástasis. Dada su importancia, se analizaron los niveles de ambas gelatinasas en los dos tipos tumorales, MSI-H y MSI-L/MSS.

En principio, ambas metaloproteasas mostraban niveles elevados en las muestras tumorales en comparación con sus correspondientes controles no tumorales. Lo más reseñable fue el constatar que la MMP-9 mostraba niveles de expresión significativamente más elevados en tumores MSI-H frente a tumores MSI-L/MSS. Posteriormente, se procedió a analizar la actividad enzimática de estas proteínas, ya que las metaloproteasas se secretan como zimógenos que deben ser activados. Los

resultados a partir de los correspondientes zimogramas mostraron que la actividad de MMP-9 resultó ser significativamente menor en tumores MSI-H en comparación con tumores MSI-L/MSS (Morán et al, 2002). La conclusión primera que se extrajo de estos datos fue que los tumores con alta inestabilidad en microsatélites expresaban una gran cantidad de MMP-9, pero que esa proteína carecía de actividad, al tratarse principalmente de la forma proMMP-9, zimógeno de la proteína activa. Este primer dato obtenido resultaba lógico, puesto que los tumores MSI-H son menos invasivos que los tumores MSI-L/MSS.

I. II MMP-3

MMP-3 o estromelisina-1, ha sido descrita como la enzima responsable de la activación de la proMMP-9 en un proceso directo y secuencial (Ogata et al, 1992). La hipótesis que se planteó en nuestro grupo, en función de los resultados previos, era que la proMMP-9 no era procesada a su forma activa por algún fallo en la síntesis o actividad de MMP-3. Por ello, el siguiente paso en esta investigación fue el estudio de expresión de *MMP-3* por PCR cuantitativa a tiempo real. En efecto, los niveles de ARNm para *MMP-3* en tumores MSI-H fueron significativamente menores frente a los detectados en tumores MSI-L/MSS (Morán et al, 2002), hecho que vendría a explicar la menor activación de MMP-9 en tumores con alta inestabilidad en microsatélites.

Por otro lado, el polimorfismo A₅/A₆ (posición -1171) del promotor de *MMP-3* tiene influencia en la expresión de la proteína y, en consecuencia, en el proceso carcinogénico (Hinoda et al, 2002; Biondi et al, 2000; Ye et al, 1996). Así, se secuenció el promotor del gen, encontrándose el polimorfismo A₅/A₆ ya descrito, además de otras alteraciones en como la mutación C₆/C₅ adyacente a A₅/A₆ en las muestras clasificadas como MSI-H. Estas alteraciones eran características del fenotipo mutador. Sin embargo, las muestras MSI-L/MSS no mostraron alteración alguna en estas secuencias (Morán et al, 2002).

Para confirmar que la presencia de dichas alteraciones en el promotor era la causa de un descenso en la expresión de *MMP-3*, se realizaron una serie de

construcciones en las que se asociaba el promotor de *MMP-3* y el gen codificante para luciferasa. El ensayo se realizó con dos construcciones con el promotor mutado y otra con el promotor sin ninguna alteración. En el caso de las construcciones con promotores mutados, se eligió uno con un alto grado de mutaciones y el otro con menor grado de mutaciones. De esta forma se confirmó que las mutaciones en el promotor reducían los niveles de luciferasa al compararse las construcciones con el promotor mutado y el no mutado. El tratamiento con TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), agente inductor de este promotor, incrementó los niveles de expresión de luciferasa en todos los casos, pero en mucha menor medida para los casos de los promotores mutados. El tratamiento con dexametasona, agente inhibidor, descendió la expresión en las construcciones, más acusadamente en las que tenían el promotor sin alteraciones y con bajo grado de mutaciones (Morán et al, 2005).

I. III E-CADHERINA

E-cadherina es otra de las dianas catalíticas de *MMP-3* (Noë et al, 2001). La lisis de E-cadherina afecta a sus funciones, viéndose especialmente afectada la adhesión. Considerando los resultados anteriores en cuanto a la diferente expresión de *MMP-3* en tumores MSI-H y MSI-L/MSS y, por ende, la diferente activación de su diana, la *MMP-9*, se estudió el *status* de E-cadherina en tumores colorrectales con y sin inestabilidad en microsatélites. Una vez más se constató una mayor integridad de esta molécula de adhesión en tumores MSI-H frente a tumores MSI-L/MSS (Ortega et al, 2008).

E-cadherina, para llevar a cabo su función en adhesión celular, mantiene unido en su cola citoplasmática un complejo formado por α - y β -catenina, que por último se une a los filamentos de actina (Rubinfeld et al, 1995). En los resultados de este trabajo, se constató que a raíz del truncamiento de E-cadherina en cánceres de la vía supresora, lo cual conduce a la inestabilidad del complejo de cateninas/actina, existía un incremento significativo de los niveles nucleares de β -catenina (Ortega et al, 2008).

II. OBJETIVOS

En base a los resultados previos de nuestro grupo de investigación, resumidos en esta Introducción, en el presente trabajo nos propusimos como OBJETIVOS los que se relacionan a continuación:

1. Analizar la expresión génica de las moléculas relacionadas con la vía WNT en tumores colorrectales primarios, de naturaleza esporádica, con y sin inestabilidad en microsatélites.

2. Estudio de los genes implicados en la vía WNT y con expresión diferencial en tumores humanos, con y sin inestabilidad en microsatélites, en líneas celulares humanas de cáncer colorrectal.

3. Examen de la expresión génica de moléculas de matriz extracelular y adhesión en tumores colorrectales primarios esporádicos, con y sin inestabilidad en microsatélites.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

A. CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal constituye hoy en día uno de los tipos tumorales más frecuentes a nivel mundial y en concreto en los países desarrollados. El número de muertes por cáncer en España sitúa al cáncer de colon como la segunda causa más frecuente en el año 2006, tras el cáncer de pulmón, según datos del Instituto Nacional de Estadística y del Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III. Los datos estimados para la Unión Europea en 2006, mostraron que el cáncer colorrectal era el tercer tipo tumoral de mayor incidencia, tras los tumores de mama y próstata, y el segundo en mortalidad, tras el cáncer de pulmón (Ferlay et al, 2007). Las estimaciones en los Estados Unidos para el 2007, emplazan al cáncer colorrectal como segunda causa de incidencia y mortalidad respecto al resto de tipos tumorales (www.cancer.org).

Los factores de riesgo que se han descrito respecto a los tumores colorrectales están relacionados con factores dietéticos, estilo de vida y efectos secundarios a intervenciones médicas. Dietéticamente, el bajo consumo de fruta, vegetales y fibra, además del consumo de carnes rojas, así como un estilo de vida sedentario, parecen ser factores de riesgo, aunque la falta de consistencia de los diferentes estudios impide afirmarlo categóricamente (Lin, 2009; Coyle, 2009). Pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal crónica y con enfermedad de Crohn presentan también un mayor riesgo de padecer cáncer de colon (Ekbom et al, 1990, Munkholm et al, 1990). Sin embargo la relación entre cáncer colorrectal y la enfermedad de Crohn no ha mostrado resultados tan consistentes como la correspondencia entre este tipo de tumor y la colitis ulcerosa crónica (Maykel et al. 2006). Por otro lado, se ha relacionado el consumo de tabaco con el desarrollo y la promoción del cáncer de colon debido a la presencia de nicotina (Wong et al, 2007), así como con un incremento en la mortalidad (Colangelo et al, 2004). En concreto, fumadores activos presentan más riesgo de hiperplasia de los pólipos que sujetos no fumadores, fumadores ocasionales o ex-fumadores (Ji et al, 2006).

A. 1 CLASIFICACIÓN TUMORIGÉNICA

Los tumores colorrectales se clasificaron según el sistema propuesto por primera vez por el Dr. Cuthbert E. Dukes en 1932. Esta clasificación comprendía tres agrupaciones, A, B y C, según el tumor estuviese limitado a la pared intestinal, hubiese invasión a través de la pared o bien se hubiesen alcanzado los ganglios linfáticos regionales. Posteriormente se fueron añadiendo subapartados por Astler y Collier, 1954, Turnbull en 1967 y Gunderson y Sosin en 1974. Hoy en día se emplea la siguiente clasificación:

- A: Tumor limitado a la mucosa.
- B: B1 → Tumor que invade la *muscularis* propia.
B2 → Tumor que atraviesa la *muscularis* propia y llega a la grasa pericólica.
B3 → Tumor con invasión de órganos cercanos.
- C: C1 → Tumor B1 con afectación de los nódulos linfáticos.
C2 → Tumor B2 con afectación de los nódulos linfáticos.
C3 → Tumor B3 con afectación de los nódulos linfáticos.
- D: Tumor con metástasis distantes

Otro sistema de clasificación, muy frecuentemente empleado es el TNM (*Tumor/Nodes/Metastasis*), desarrollado por el *American Joint Committee on Cancer*:

- T: Según el grado de invasión en la pared intestinal:
 - T0: Sin evidencia de tumor.
 - Tis: Cáncer *in situ* (tumor presente pero sin invasión).
 - T1: Invasión a través de la *muscularis* mucosa hacia la submucosa.
 - T2: Invasión a través de la submucosa hacia la *muscularis* propia.
 - T3: Invasión a través de la *muscularis* propia hacia la subserosa pero no hacia otros órganos anexos.
 - T4: Invasión de estructuras cercanas.

- N: Grado de infiltración de los nódulos linfáticos:
 - N0: Sin afectación de nódulos linfáticos.
 - N1: De uno a tres nódulos linfáticos afectados.
 - N2: Cuatro o más nódulos linfáticos afectados.
- M: Grado de metástasis:
 - M0: Sin metástasis.
 - M1: Con metástasis presentes.

Dadas estas características, se clasificarían los tumores colorrectales en cuatro estadios (Tabla A):

ESTADIO	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
II	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3, T4	N1	M0
	Cualquier T	N1	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla A. Descripción de los estadios en cáncer colorrectal en función de su clasificación TNM (National Cancer Institute).

A. 2 CÁNCER HEREDITARIO Y ESPORÁDICO

A.2.1 CÁNCER HEREDITARIO

Los cánceres colorrectales de tipo hereditario constituyen alrededor de un 10-15% de los casos, y engloban principalmente a dos tipos de síndromes familiares: FAP (*Familial Adenomatous Polyiposis*) y HNPCC (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*).

A.2.1.1 FAP

FAP es un síndrome autosómico hereditario caracterizado por la aparición temprana de numerosos pólipos en el colon, que confieren una mayor probabilidad de desarrollar cáncer colorrectal (Grodén et al, 1991). La particularidad genética es la presencia de mutaciones en un alelo del gen supresor de tumores *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) que darían lugar a la reducción de la actividad de la correspondiente proteína. Dichas mutaciones son dominantes en cuanto a la formación de pólipos, pero recesivas en cuanto a la generación del tumor (Grodén et al, 1991). Los pacientes con FAP desarrollan de cientos a miles de adenomas en el colon durante la segunda o tercera década de su vida (Kinzler and Vogelstein, 1996). Si bien la formación de pólipos podría necesitar de la mutación en otro gen, ya que todas las células epiteliales del colon del paciente heredan la mutación en *APC*, pero solo unas pocas se convierten en precursoras de pólipos (Grodén et al, 1991). La clínica que manifiestan los pacientes con este síndrome no es homogénea, a pesar de que todos tienen mutaciones hereditarias en *APC* y en la misma región C-terminal del gen, dependiendo el fenotipo de la clase y localización específica de la mutación en dicha región (Kinzler and Vogelstein, 1996). La edad media de diagnóstico de cáncer en pacientes con FAP no tratado es de 42 años (Kinzler and Vogelstein, 1996).

Los pacientes con FAP que desarrollan cáncer colorrectal presentan otro evento que altera el alelo restante de *APC* (Yeung et al, 2008). Este fenómeno se conoce como la teoría de los dos eventos o *two hits* (Knudson, 2001). Sin embargo, estudios recientes hablan de la hipótesis de los *three hits* o los tres eventos (Segditsas et al, 2009; Knudson, 2001) en la que las alteraciones en el gen deben producirse en al menos tres eventos independientes, atendiendo a la naturaleza triploide (o poliploide) de algunas células tumorales, consiguiendo así el grado de inactivación suficiente para todas las copias alélicas del gen. También influye en el número de eventos necesarios para llegar a la tumorigénesis que las células dispongan de ventaja proliferativa y/o mutaciones hereditarias previas como ocurre en los pacientes con FAP (Knudson, 2001).

A.2.1.2 HNPCC

Los síndromes hereditarios del tipo HNPCC, anteriormente denominados síndrome de Lynch, dan lugar a cáncer colorrectal constituyendo un 3% del total de los casos. Sin embargo este dato podría estar estimado a la baja, debido a la dificultad de valorar estrictamente el diagnóstico de este tipo de cáncer (Salovaara et al, 2000). Fue descrito por primera vez en 1913 por Alfred Warthin. Posteriormente Lynch lo caracterizó y le dio nombre. Fue clínicamente definido por los criterios de Amsterdam y Bethesda años después (Rodríguez-Bigas, 1997). Se trata de un proceso que se hereda de forma autosómica y dominante (Chung and Rustgi, 2003). Poseen mutaciones hereditarias en los genes de reparación (*MMR, MisMatch Repair*) *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2* y *PMS1*, siendo más frecuentes en *MSH2* y *MLH1*, con un 90% de los casos (Söreide et al, 2006). Las mutaciones en *MHS6* son menos frecuentes (Oliveira et al, 2004) y los casos de *PMS1* y *PMS2* son raros (Revisado por Pawlik et al, 2004). Los tumores surgen por inactivación somática del gen que previamente estaba mutado en la línea germinal (Mecklin, 2008) ya sea por pérdida de heterozigosidad (*LOH, Loss Of Heterozigosity*), mutaciones somáticas o hipermetilación de promotores (Imai et al, 2008). La inactivación de estos genes del MMR provoca que estos pacientes cuenten con alteración de las secuencias repetitivas o microsatélites. Este punto se desarrollará con más detalle en el apartado (A.2.2.2) en el que se describe la vía del fenotipo mutador más adelante.

Al igual que en el caso de pacientes con FAP, la edad media de diagnóstico de cáncer entre los casos con HNPCC es de 45 años. La frecuencia de formación de adenomas es similar a la de la población normal, pero debido a la alteración de genes del MMR, la tasa de mutaciones es del orden de 2 a 3 veces mayor, resultando en una acumulación mayor de mutaciones y en una más rápida progresión hacia la malignidad (Pawlik et al, 2004; Kinzler and Vogelstein, 1996). Clínicamente se definen dos tipos de HNPCC: tipo I, si los tumores se localizan exclusivamente en el colon; o tipo II, si se observan tumores fuera del colon (Chung and Rustgi, 2003).

Los pacientes con HNPCC desarrollan adenomas en un número finito que pueden pasar a ser malignos en un breve espacio de tiempo como ya se ha señalado, en comparación con los FAP cuyos pólipos son más difusos (Chung and Rustgi, 2003). Los tumores muestran una histología mucinosa, con infiltración linfocitaria y son poco diferenciados, características que comparten con los tumores esporádicos con alta inestabilidad en microsatélites (Boland et al, 1998). Son además tumores de tipo diploide, en contraposición a los tumores esporádicos (Chung and Rustgi, 2003). Por otro lado, los tumores HNPCC presentan algunas de las características de los adenomas convencionales, como son la presencia de mutaciones en *APC*, β -catenina (*CTNNB1*) y/o *k-ras*. La infiltración linfocitaria y la co-existencia de adenomas son otras particularidades de los tumores HNPCC (Jass, 2004).

A.2.2 CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO

Constituye el tipo mayoritario de cáncer en cuanto a frecuencia y no cuenta con ninguna implicación de origen hereditario en su génesis. En cuanto a las vías carcinogénicas principales que puede seguir, serían las conocidas como vía supresora y vía del fenotipo mutador.

A.2.2.1 Vía Supresora

La vía supresora se conoce también como CIN (*Chromosomal INstability*) y fue inicialmente descrita por Fearon y Vogelstein en 1990. Se caracteriza por tener inestabilidad cromosómica con pérdidas alélicas en los cromosomas 5q, 17p y 18q, además de mutaciones en el gen *ras*, que principalmente actuarían no como iniciadoras del tránsito de adenoma a carcinoma, pero sí favoreciendo la proliferación. El modelo tumorigénico de Fearon y Vogelstein se estructura a través de un esquema secuencial (Figura A). Se inicia con la formación de un adenoma, que gradualmente aumenta de tamaño, adquiriendo alteraciones génicas que desembocarían en el carcinoma final y en posibles metástasis. Sobre este diseño se observa que lo más frecuente es que ocurra primero la pérdida o inactivación del gen *APC* en el cromosoma 5q. De hecho, en el caso del colon, mutaciones en *k-ras* o *p53*, que

precedan a las de *APC*, no implican el desarrollo de adenomas en el epitelio, de tal manera que se considera a *APC* un *gatekeeper* (Kinzler and Vogelstein, 1996). A continuación, aparecerían las mutaciones en *k-ras* (cromosoma 12p), así como las pérdidas cromosómicas en 18q (*DCC*) y 17p (*p53*) (Fearon and Vogelstein, 1990). En este trabajo afirman que en la serie de tumores colorrectales estudiados, más del 90% de los carcinomas poseen dos o más de las alteraciones señaladas, aunque otros trabajos más recientes (Smith et al, 2002; Lüchtenborg et al, 2005) aseveran que encuentran alteraciones simultáneas en *APC*, *k-ras* y *p53* en menos del 10% de los casos, aunque sí coinciden en que la aparición de mutaciones en *APC* y *k-ras* puede ocurrir de forma codependiente (Lüchtenborg et al, 2005). Estos mismos autores proponen la existencia de múltiples y alternativos procesos de tumorigénesis.

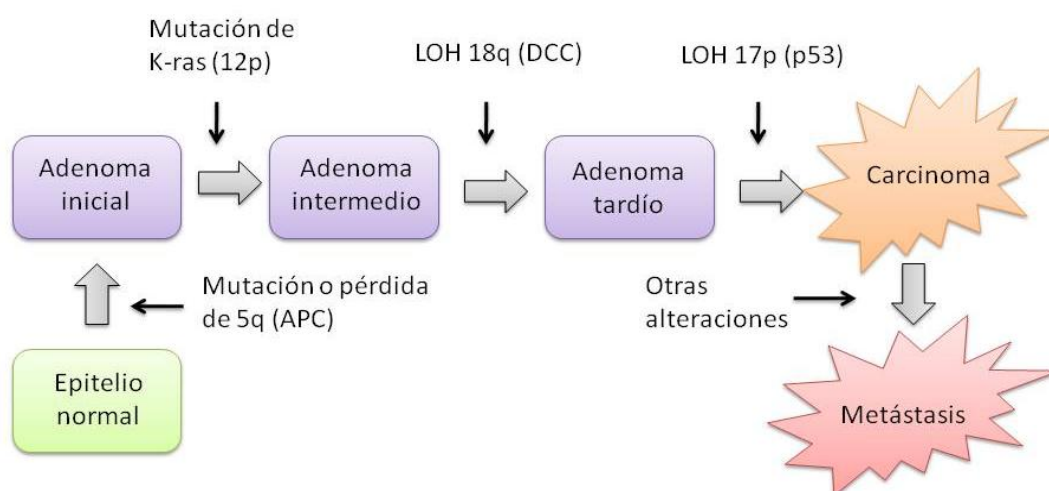


Figura A. Esquema secuencial de mutaciones para el cáncer colorrectal esporádico según el modelo descrito por Fearon y Vogelstein en 1990.

A.2.2.2 Vía del fenotipo mutador

La otra vía principal descrita en la carcinogénesis colorrectal es la vía del fenotipo mutador. Esta otra forma de carcinogénesis que tiene como diana los genes reparadores del ADN del *MisMatch Repair* (MMR) *System* o sistema de reparación de

errores. Se trata de un conjunto de genes encargados del reconocimiento y la reparación de errores que ocurren durante la replicación del ADN. Este grupo de genes repara desapareamientos espontáneos o producidos por desaminación, oxidación o metilación de bases que tienen lugar durante la replicación del ADN. El error en el apareamiento es reconocido por las proteínas hMSH2, hMSH3 y hMSH6 que forman parte del complejo MutS. Éstas a su vez se asocian con hMLH1, hMLH3, hPMS1 y hPMS2 (complejo MutL). Así, hMSH2 reconoce el error de la replicación en la hebra hija, y forma un heterodímero con hMSH6 o hMSH3, según se trate de desapareamientos tipo base-base o bien *loops* por inserción/delección; o más de una base insertada o delecionada. A continuación, un complejo formado por hMLH1 y hPMS2 repara las bases desapareadas junto con la exonucleasa I y la polimerasa δ (Palombo et al, 1996; revisado por Chung and Rustgi, 2003, revisado por Christmann et al, 2003). El evento más frecuente en la génesis de tumores esporádicos del fenotipo mutador es la inactivación de *hMLH1* por hipermetilación del promotor (Kane et al, 1997; Cunningham et al, 1998).

Las secuencias microsatélite son secuencias repetitivas en tándem de uno a cinco nucleótidos. Una de las repeticiones más comunes es el dinucleótido (CA)_n. Cuando un microsatélite tiene variaciones en el número de repeticiones de forma estable de persona a persona y es hereditario, se dice que es polimórfico (de la Chapelle, 2003). Estas secuencias son propensas a sufrir errores en la replicación dada su redundancia en la secuencia nucleotídica. Las mutaciones en los genes de reparación del ADN del sistema MMR conducen a un cúmulo de errores en los microsatélites. A partir de este hecho, los tumores colorrectales se han venido clasificando en función de su estabilidad o inestabilidad en microsatélites. El descubrimiento de la inestabilidad en microsatélites estuvo desde un primer momento ligado a los tumores HNPCC, puesto que estos tumores se desarrollan por causas análogas a los tumores con inestabilidad en microsatélites.

A nivel internacional, a través del panel del *National Cancer Institute* (Boland et al, 1998), se definió el término MSI (*MicroSatellite Instability*) como aquel más idóneo para referirse a tumores con alteraciones en la longitud de los microsatélites. En este

mismo trabajo internacional se clasificaron los tumores en función de las mutaciones en los siguientes marcadores asignados como panel de referencia para estudiar la inestabilidad en microsatélites: dos secuencias de repeticiones mononucleotídicas (Bat25 y Bat26) y tres microsatélites con repeticiones dinucleotídicas (D5S346, D2S123 y D17S25). De esta manera, podemos clasificar a los tumores como:

- ✓ MSI-H (*MicroSatellite Instability-High*): Deben tener mutaciones en dos o más marcadores.
- ✓ MSI-L (*MicroSatellit Instability-Low*): Deben tener mutado uno de los marcadores.
- ✓ MSS (*MicroSatellite Stable*): No deben tener mutaciones en ninguno de los marcadores.

En 1995 se detectaron deleciones de una o dos bases en una repetición mononucleotídica de (A)₁₀ en el gen del receptor de tipo II del TGF- β (*Tumour Growth Factor- β*) en líneas celulares de cáncer de colon MSI-H (Markowitz et al, 1995). Las mutaciones en dicho gen en tumores con inestabilidad en microsatélites es elevada (Salovaara et al, 2000). En la conclusión final del trabajo de Markotwitz et al, se hipotetizó que las repeticiones nucleotídicas de dicho gen podrían ser diana del fenotipo mutador y que este hecho le conferiría una ventaja proliferativa a dichas células. Este trabajo fue uno de los primeros en definir al *TGF β RII* como diana del fenotipo mutador. Sobre este hecho se ha investigado describiendo nuevas posibles dianas del fenotipo mutador en secuencias codificantes o reguladoras. Así, otros genes diana del fenotipo mutador que se han ido describiendo posteriormente son: *IGFIIR*, *MSH3*, *MSH6*, *BAX*, *caspasa 5*, *E2F4*, *TCF-4*, *BCL-10*, *axina*, *hRAD50*. Sin embargo, mutaciones en *APC*, *k-ras* o *TP-53*, así como LOH en 5q, 17p y 18q, eventos típicos de la vía supresora, son de reducida frecuencia si no ausentes en estos tumores (Revisado por Jass et al, 2002; Pawlik et al, 2004).

Al igual que para la vía supresora, se sugirió un modelo de carcinogénesis para el caso de MSI. Se podría considerar que una sola alteración de los genes diana no confiere capacidad de progresión al tumor, sino que debe ser tomada como parte de

un grupo de eventos (Duval et al, 2001). Así, las nuevas dianas que se vayan describiendo para MSI-H tendrán su pequeña aportación con su correspondiente consecuencia, pero siempre considerándolo como parte de un conjunto total de alteraciones. Aún así se podría definir una pequeña guía con las mutaciones más frecuentes en la vía del fenotipo mutador (Figura B).

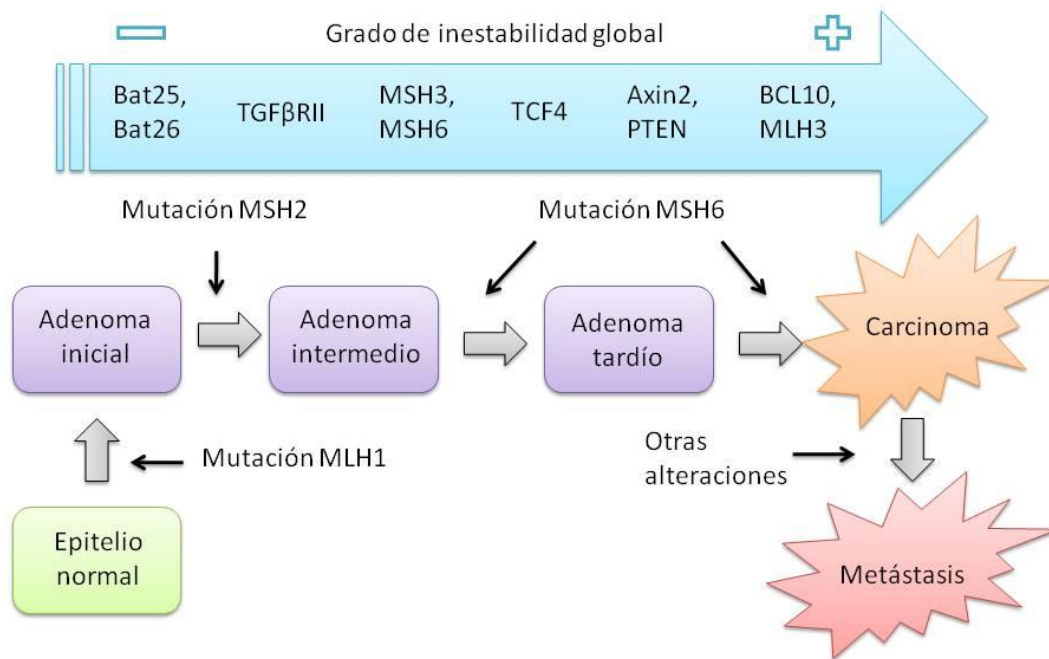


Figura B. Modelo de desarrollo de carcinogénesis colorrectal a través de la vía del fenotipo mutador (Adaptado de Duval et al, 2001 y Søreide et al, 2006).

Las características clinicopatológicas de los tumores esporádicos MSI-H son su localización en colon derecho, histología mucinosa y heterogénea, alta tasa de infiltración linfocitaria y escasa diferenciación (Ward et al, 2001; Benatti et al, 2005). Por otro lado, los tumores del fenotipo mutador presentan mejor pronóstico que tumores sin inestabilidad en microsatélites (Samowitz et al, 2001; Benatti et al, 2005). Dada su proximidad genética, los tumores esporádicos del fenotipo mutador comparten muchas características con los tumores hereditarios HNPCC. Ambos presentan mutaciones en los genes del complejo MMR de reparación del ADN,

localización preferente en el colon derecho, histología mucinosa e infiltración linfocitaria (Chung and Rustgi, 2003). Sin embargo, existen ciertas diferencias. Los cánceres colorrectales HNPCC se dan en sujetos más jóvenes que los tumores esporádicos con MSI-H (Jass, 2004). Por otro lado, los tumores esporádicos con MSI-H se originan fundamentalmente por hipermetilación del promotor del gen *MLH1* (Kane et al, 1997; Cunningham et al, 1998), mientras que en el caso de HNPCC dicho gen se altera por mutaciones en la línea germinal, donde no suele estar implicada la hipermetilación, seguida de un segundo evento. Puede existir un fenotipo “metilador” en determinadas familias, pero debe estar diferenciado de los HNPCC (Jass, 2004). Los tumores esporádicos con el promotor de *MLH1* hipermetilado, presentan una tasa menor de mutaciones en *k-ras* que los tumores HNPCC, cuya frecuencia se asemeja a la de tumores estables para microsatélites (Oliveira et al, 2004). Por otro lado, las mutaciones en *BRAF* son más frecuentes en tumores con *hMLH1* hipermetilado que en tumores MSS/HNPCC (Deng et al, 2004). También se ha encontrado una mayor frecuencia de mutaciones en *CTNNB1* en tumores esporádicos con inestabilidad en microsatélites que en tumores estables. Estos tumores, además, de localizarse en colon derecho y ser poco diferenciados, se desarrollan en pacientes de edad avanzada y sobre todo en mujeres (Lüchtenborg et al, 2005). En cuanto al tratamiento por quimioterapia, los resultados no terminan de ser concluyentes. Se han publicado trabajos en los que dicho tratamiento mejora la supervivencia de pacientes afectados de tumores sin inestabilidad en microsatélites, pero no supone ventaja alguna para pacientes con tumores con inestabilidad (Ribic et al, 2003; Benatti et al, 2005).

La definición del grupo de tumores MSI-L presenta ciertas discordancias en cuanto a su existencia real o no. Algunos trabajos exponen claras diferencias en las características clínicas, e incluso en la frecuencia de mutaciones en *p53* y *k-ras* entre MSI-L y MSI-H, pero no entre MSI-L y MSS (Ward et al, 2001). Otros estudios no encuentran diferencias en las características clinicopatológicas ni en las variables moleculares entre los tumores MSI-L y los MSS. En dichos análisis se encuentra una gran diversidad de presencia de inestabilidad en marcadores en lo que vendrían a ser los llamados tumores MSI-L, atribuyendo dicha variabilidad a la evolución específica de

cada uno de los tumores. Dichas diferencias en la variación de inestabilidad en microsatélites son más del tipo cuantitativo que cualitativo (Halford et al, 2002).

B. VÍA WNT

En 1982 Nusse y Varmus descubrieron el oncogén *int-1* que inducía tumores mamarios por activación a través de inserción por el virus tumoral MMTV (*Mouse Mammary Tumour Virus*). Este oncogén se vio que era similar al gen *wingless* (*Wg*) de *Drosophila melanogaster*, siendo además la estructura del gen *int-1* muy similar entre mamíferos y moscas (Rijsewijk et al, 1987). Durante ese periodo se identificaron otros oncogenes que fueron nombrados *int-2* e *int-3* que, sin embargo, resultaron totalmente independientes entre sí. Posteriormente se descubrió en ratón otra serie de genes de los que *int-1* era prototipo. Dichos genes codificaban para polipéptidos de unos 40 kd supuestamente aptos para ser secretados. Ante la similitud de estos genes se denominó a este nuevo grupo de genes *Wnt*. Por tanto, *Wnt* proviene de *wingless-type MMTV integration type site (int-1)* (Nusse et al, 1991). Los ligandos Wnt entonces dieron nombre a la cascada de activación que ellos iniciaban, la vía WNT. Los homólogos de los genes *Wnt* de ratones fueron denominados *WNT* en humanos. En ambos casos se fue dando una numeración correlativa en función de la aparición de nuevos componentes de la familia.

B.1 VÍA WNT CANÓNICA

La vía WNT tiene entre sus funciones biológicas el control del desarrollo embrionario, induciendo proliferación y diferenciación. Si esta vía tiene algún tipo de alteración en su funcionamiento, puede llevar a un crecimiento celular descontrolado y a la formación de tumores. De hecho, estudios moleculares indican que alrededor de un 90% de los tumores colorrectales desarrollan mutaciones en alguno de los componentes de la vía WNT (Giles et al, 2003).

B.1.1 Los ligandos: la familia WNT y sus inhibidores

Los ligandos de la vía WNT se denominan genéricamente WNTs. Hasta la actualidad se han descrito 19 miembros de la familia en humanos. Estos ligandos son glicoproteínas que actúan en las células vecinas. Todos ellos presentan una estructura similar además de un peso entre 39 kDa (WNT7a) y 46 kDa (WNT10a). La mayoría de ellos comparte el 35% de la secuencia, si bien miembros de la misma serie (WNT3, WNT3a) pueden llegar a tener una homología del 58 al 83%. Se sabe que los correspondientes ortólogos de los genes humanos en otros organismos vertebrados conservan, a su vez, un elevado porcentaje de similitud (Revisado por Miller, 2002). Son moléculas hidrófobas y estructuralmente presentan riqueza de residuos cisteína, característica que comparten con el oncogén *int-1* (Rijsewijk et al, 1987; Fung et al, 1985). Se postula que dicha composición favorezca la formación de puentes disulfuro que puedan ser esenciales para la estructura secundaria de la proteína (Miller, 2002), o bien como parte del mecanismo de unión a su correspondiente receptor *Frizzled*, como se verá más adelante. El propio receptor posee un dominio rico en cisteína (CRD, *Cystein Rich Domain*) el cual podría adoptar una conformación que facilitase la interacción con los ligandos WNT (Dann et al, 2001). Estas moléculas poseen además residuos palmitoilo asociados a las cisteínas estructurales (Willert et al, 2003; Takada et al, 2006). Mientras que algunos autores señalan que el residuo palmitoilo se emplea para la interacción con el receptor (Nusse, 2008), otros plantean que esta modificación lipídica desempeña un papel en el transporte interno de estas moléculas gracias a partículas lipídicas empaquetadas (Takada et al, 2006). Los ligandos WNT suelen estar asociados a las membranas celulares y a la matriz extracelular. La modificación lipídica que adoptan también podría estar dirigiendo a estas moléculas a determinados dominios de la membrana (Nusse, 2008).

La funcionalidad de estos ligandos no está completamente estudiada. Se cree que el extremo C-terminal de la proteína podría conferir especificidad de función, aunque no de forma exclusiva, pues el extremo N-terminal también se identificó como necesario para la interacción con el receptor (Du et al, 1995). Se tiende a clasificar estos ligandos en función de los eventos que desencadenan al unirse a los receptores.

Así, se incluye a los WNT1, 3a, y 8 como ligandos más reconocidos de la vía canónica de WNT, mientras que WNT4, 5 y 11 serían los más destacados como ligandos no canónicos (Du et al, 1995). Esta clasificación clásica en función del tipo de efecto que provoca el ligando podría no ser tan acertada, pues existen autores que describen a los receptores como responsables del tipo de vía activada (Amerongen, 2008). Así, por ejemplo, WNT5a, considerado como ligando no canónico, es capaz de activar la expresión de luciferasa en ensayos de *SuperTOPFlash* en presencia de los receptores mFz4 y LRP5, pero pierde esta propiedad si es LRP6 el que está presente o no se expresa mFz4 (Mikels and Nusse, 2006).

Los ligandos WNT pueden ser bloqueados por un inhibidor denominado WIF1 (*WNT Inhibitor Factor 1*). Estas proteínas hidrosolubles poseen un dominio N-Terminal de unos 150 aminoácidos que se conoce como WD (*WIF Domain*), por el que es capaz de unirse a los ligandos WNT reprimiendo su actividad. A continuación poseen cinco repeticiones tipo EGF (*Epidermal Growth Factor*) y un extremo C-terminal de tipo hidrofílico (Hsieh et al, 1999). WIF1 posee islas CpG en su promotor (Reguart et al, 2004) susceptibles de ser metiladas como método de regulación de su expresión. Se ha descrito que este gen se encuentra silenciado por hipermetilación en un alto porcentaje de tumores gastrointestinales, entre ellos el cáncer colorrectal, y de pulmón (Taniguchi et al, 2005; Mazieres et al, 2004).

B.1.2 Los receptores de la vía WNT: procesos de regulación a nivel de membrana

Los primeros receptores analizados para la vía WNT fueron los Frizzled, de los cuales se han descrito 10 genes en humanos hasta la fecha. Inicialmente se conocía el gen *fz* (*frizzled*), descubierto en *Drosophila* (Vinson et al, 1989). Posteriormente, y gracias al empleo de diferentes librerías de ADNc, se han ido ampliando los componentes de esta familia en los distintos organismos (*Xenopus*, *Drosophila*, rata, ratón, humano...). Su estructura posee un péptido señal en el extremo N-terminal. A continuación existe un dominio altamente conservado de 120 aminoácidos que presenta 10 cisteínas invariables, las cuales pueden formar puentes disulfuro (CRD). La secuencia continúa con una región hidrofílica de gran variabilidad que funciona separando el extremo C-terminal. Este último fragmento se compone de 220-250

aminoácidos distribuidos en siete segmentos hidrofóbicos de unos 20-25 aminoácidos cada uno, separados entre sí por regiones hidrofílicas (Wang et al, 1996). Estas regiones hidrofóbicas componen los siete fragmentos transmembrana característicos de esta familia de receptores.

Se ha catalogado a los receptores Frizzled como receptores acoplados a proteínas G o GPCR (*G Protein Coupled Receptor*) (Fredriksson et al, 2003). Las proteínas G “grandes” se constituyen de un heterotrímero formado por las subunidades α , β y γ . La subunidad α permanece anclada al dímero $\beta\gamma$ y unida a GDP. Cuando el GPCR correspondiente se activa por unión de un ligando, se permite el intercambio GDP-GTP en la subunidad α . En este momento se libera la subunidad $G\alpha_o$ -GTP que es la forma activa. En un trabajo realizado en *Drosophila* se demostró que gracias a la señal Wg/Fz se realizaba la conversión Go-GDP a Go-GTP, lo que resultó ser un evento esencial para la señalización. De hecho, la sobreexpresión de Go-GTP favoreció la expresión de las dianas WNT (Katanaev et al, 2005). Por otro lado, la depleción de las dos subunidades $G\alpha_o$ y $G\alpha_q$ reduce la señalización WNT a través de Fz1, confirmando un papel esencial de las proteínas G en la activación β -catenina-Lef/TCF. (Liu et al, 2001; Katanaev et al, 2005). Se ha descrito cómo Go es de hecho capaz de interaccionar físicamente con axina a través del dominio RGS de la misma. Este evento desestabilizaría el complejo de degradación activando la señal WNT (Egger-Adam et al, 2009). A su vez, el dímero $\beta\gamma$ atraería a Dvl favoreciendo también una regulación positiva de la cascada (Egger-Adam et al, 2009). Sin embargo, según algunos autores, no se pueden afirmar que Go sea el transductor exclusivo de las señal WNT, ya que otros complejos triméricos podrían estar involucrados así como otras proteínas no relacionadas con proteínas G (Katanaev et al, 2005).

Las sFRP (*secreted Frizzled Related Proteins*) son proteínas secretadas, que dada su similitud con los receptores de la vía WNT, funcionan como inhibidores al competir con los receptores en su unión a los ligandos WNT. Poseen una alta similitud con el dominio extracelular de los receptores, o CRD, sin poseer los dominios transmembrana, lo que les permite ser elementos solubles (Leyns et al, 1997).

La señal WNT, aparte de los receptores de la familia *Frizzled*, necesita de otro correceptor. Los LRP son *LDL (Low Density Lipoprotein) receptor Related Proteins*, y en vertebrados se han descrito dos, LRP5 y LRP6. Son proteínas con un solo dominio transmembrana que poseen repeticiones de receptor LDL y tipo EGF, aunque en orden inverso a los LDL. Además, estas proteínas poseen un alto grado de similitud con su ortólogo *arrow* en *Drosophila*, proteína necesaria para la recepción y transducción de la señal *wingless* en *Drosophila*. Tanto es así que la no expresión de *arrow*, aún en presencia de dFz2, genera un fenotipo similar al producido por mutantes que no expresan *wingless* (Wehrli et al, 2000). Por extensión, se ha comprobado que los LRP5/6 son necesarios a la hora de la activación de la cascada (Pinson et al, 2000; Tamai et al, 2004).

El mecanismo por el que los ligandos activan el complejo ternario, formado en este caso por WNT, Fz y LRP no está completamente comprendido. Se sabe que LRP6 posee cinco repeticiones del tipo PPPSP que son necesarias para la función de señalización, aunque se ha comprobado que sólo la conservación de uno de esos residuos es suficiente para la actividad transcripcional β -catenina-TCF (Tamai et al, 2004). Dichos residuos son susceptibles de ser fosforilados creando así sitios de unión para axina (Tamai et al, 2004; Zeng et al, 2005). Se han encontrado dos sitios de fosforilación en los LRP6/5: sitio I (PPPSP) susceptible de fosforilación por GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase β*), y el sitio II situado tres aminoácidos más abajo en la secuencia del sitio I, y que es un sitio de fosforilación para CKI (*Casein kinase I*) (Zeng et al, 2005). La vinculación de estas dos proteínas quinasas en la regulación positiva de la vía constituye un evento destacable ya que, como se verá más adelante, ambas son consideradas claros reguladores negativos. Se necesita la presencia del receptor Fz y la estimulación WNT para que se produzca la fosforilación de LRP6 (Tamai et al, 2004). Algunos autores señalan a CKI ϵ como responsable de la fosforilación de LRP6 (Swiatek et al, 2006) o incluso CKI γ (Davidson et al, 2005). Sin embargo, los sitios de fosforilación para CKI ϵ ejercerían una regulación negativa sobre la vía WNT. Las quinasas de receptores asociados a proteínas G, GRK5 y 6 (*G protein-coupled Receptor Kinases*) son otras candidatas a la fosforilación de los residuos PPPSP de LRP6. De hecho, se ha demostrado que son capaces de dicha fosforilación y de incrementar la

actividad *TOPflash* luciferasa cuando se expresan en presencia de LRP6 (Chen et al, 2009). En este mismo trabajo, proponen que GRK5 podría encargarse de la fosforilación de LRP6 en primera instancia. Tras este primer paso, axina ya podría ser reclutado a la membrana, unirse a LRP6 fosforilado y dejar a GSK3 β libre para las sucesivas fosforilaciones de LRP6. Por otro lado, la conexión entre el receptor Fz y LRP es esencial para la activación de la señalización; incluso una proteína quimérica generada a partir de Fz2-arr (Frizzled fusionado a Arrow) permite la señalización aun en ausencia de ligandos (Tolwinski et al, 2003).

A nivel de membrana existe otro punto de regulación cuyos integrantes son las proteínas Dkk y Kremen. Dkk o Dickkopf es un componente soluble del eje WNT/ β -catenina que actúa como ligando de Kremen, proteína de tipo transmembrana. Tan solo Dkk1 ha sido descrita como antagonista de la vía WNT al unirse a su receptor Kremen 2. Ambas proteínas forman un heterotrímero con LRP6 que induce la rápida endocitosis del último, bloqueando la señal WNT (Mao et al, 2002). Se ha descrito cómo Dkk2 es incluso un potenciador de la señal. Si Kremen 2 no está presente en la membrana, la interacción LRP6-Dkk2 promueve la señal WNT, pero en presencia de Kremen2, Dkk2 ya no es capaz de estimular la vía (Mao and Niehrs, 2003). Así Kremen 2 sería el elemento regulador fundamental. Sin embargo, Dkk3 no es capaz de inhibir la señalización (Rothbächer and Lemaire, 2002).

El siguiente componente esencial en la cascada de activación es *Dishevelled* (DVL o *Dsh*). Se conocen tres genes *DVL* en humanos: *DVL1*, 2 y 3 (Pizzuti et al, 1996; Semenov and Snyder, 1997). La evolución que sigue este componente una vez recibida la señal WNT por los receptores, no está del todo elucidada. Además, es en este punto en el que la vía se diversifica en tres: lo que se viene conociendo como vía canónica, vía WNT-Ca²⁺ y PCP (*Planar cell Polarity*) (Habas and Dawid, 2005). DVL posee tres dominios característicos: dominio N-terminal DIX (DVL y Axina), dominio PDZ (*Postsynaptic density-95*, *Discs-large* y *Zonula ocludens-1*) y el dominio C-terminal DEP (DVL, Egl-10 y *Pleckstrin*) (Revisado por Lee et al, 2008).

Mientras que parece clara la unión de LRP6 y axina una vez iniciada la señal WNT, DVL parece unirse a los receptores de la familia Fz. De hecho DVL podría estar implicado en todas las funciones de Fz (He et al, 2004). DVL es capaz de unirse al extremo C-terminal del receptor Fz a través de su dominio PDZ (Wong et al, 2003). Sabiendo que DVL es capaz de unirse a axina (Li et al, 1999) y a Fz, y que por otro lado axina es capaz de unirse a LRP6 fosforilado (Zeng et al, 2008), algunos autores sugieren distintos modelos por los que el enfrentamiento de Fz unido a DVL y LRP6 unido a axina, dé lugar a la inhibición del complejo de degradación de la proteína efectora de la vía WNT, β -catenina (He et al, 2004). DVL, a su vez, puede sufrir modificaciones postransduccionales al ser fosforilado por CK1 δ/ϵ , las cuales parecen tener función redundante, siendo dichas fosforilaciones activantes de la vía (Bryja et al, 2007). Para la fosforilación de LRP6 se necesita de la presencia de axina. Además, al fosforilarse, crea nuevos sitios de unión para axina, lo que constituye un ejemplo de retroalimentación positiva, que a su vez induce la polimerización de LRP6 y la consiguiente amplificación de la señal WNT (Zeng et al, 2008).

B.1.3 El complejo de degradación de β -catenina

La activación de DVL lleva consigo la desestabilización del complejo de degradación de la proteína señal β -catenina. El complejo de degradación está formado principalmente por cinco proteínas: axina, APC (*Adenomatous polyposis coli*), GSK3 β (*Glycogen Synthase kinase β*), CK1 α (*Casein Kinase 1 α*) y β -catenina. La función esencial de este complejo consiste en regular los niveles citoplasmáticos de β -catenina. Dicha proteína se encuentra de forma constitutiva en el citoplasma y, como resultado de su fosforilación, queda marcada para su degradación en el proteasoma.

β -Catenina, además de ser la molécula efectora de la señal de activación WNT, es una proteína relacionada a su vez con la adhesión celular a través de E-cadherina. Como principal característica estructural presenta 12 repeticiones de 42 aminoácidos, denominadas repeticiones Arm por su homología con su ortólogo *Armadillo* en *Drosophila*. Dichas repeticiones forman una serie de bucles en forma de α -hélice conectados unos con otros, de forma que se crea entre ellos un corazón hidrófobo

(Huber et al, 1997). La zona de repeticiones Arm es el sitio de unión de β -catenina con diferentes proteínas como APC, cadherinas y miembros de la familia de cofactores transcripcionales TCF (Figura C).

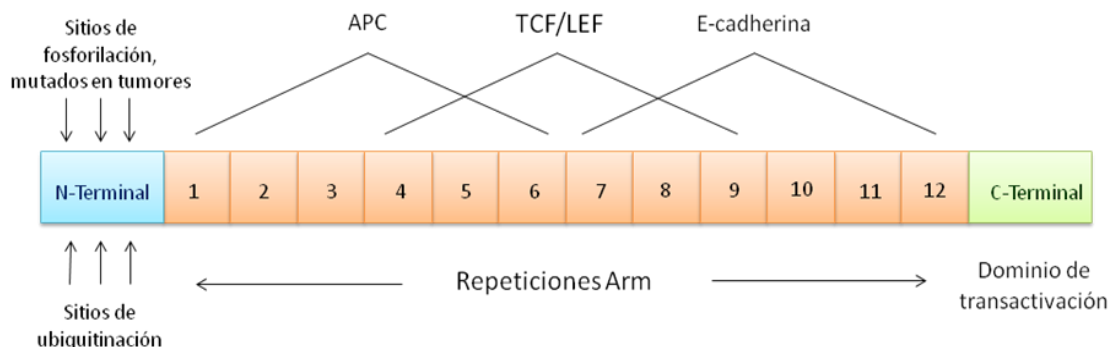


Figura C. Estructura de la proteína β -catenina. Las repeticiones Arm constituyen el sitio de unión a diferentes proteínas. Los sitios de fosforilación (Ser45, Thr41, Ser37, Ser33) suelen estar mutados en tumores (Adaptado Willert and Nusse 1998).

En estado basal, β -catenina es constitutivamente degradada en el citoplasma, debido a la fosforilación que sufre y que la marca para su procesamiento en el proteasoma. Las proteínas quinasas que participan en este proceso son GSK3 β y CKI α . El proceso secuencial de fosforilación se inicia por CKI α en la Ser45 de β -catenina, y continúa a través de sucesivas fosforilaciones por GSK3 β en los residuos Thr41, Ser37 y Ser33 en sentido carboxi-amino terminal (Liu et al, 2002; Amit et al, 2002). Las mutaciones en Ser45 inhiben las fosforilaciones por GSK3 β , así como las mutaciones en los siguientes residuos abortan a su vez las mismas (Liu et al, 2002). En su trabajo Amit y colaboradores plantean la presencia indispensable de axina, como ya se había señalado, y la regulación que ejerce DVL en la fosforilación inicial de β -catenina en Ser45. Por otro lado, los trabajos apuntan al exón 3 (códon 29-48) del gen β -catenina (*CTNNB1*) como diana principal de las alteraciones en este gen. La delección de dicho exón es un importante mecanismo de activación oncogénica (Iwao et al, 1998). Se han detectado las mutaciones de *CTNNB1* en tumores con inestabilidad en microsatélites

(Mirabelli-Primdahl et al, 1999, Sparks et al, 1998) pero tampoco es evidente que exista asociación a este respecto (Løvig et al, 2002).

Axina se ha descrito como la proteína de anclaje de todo este complejo de degradación asociado a β -catenina. Su fosforilación es esencial para su estabilidad, siendo GSK3 β responsable de dicha fosforilación. DVL estaría relacionado con la inhibición de dicha fosforilación, reduciendo por tanto la estabilidad del complejo de degradación, tras la activación de la señal por WNT3a (Yamamoto et al, 1999). En humanos se conocen dos genes *Axina1* y *Axina2* o *conductina*, que a su vez es un gen diana de la propia vía WNT. Esta particular diferencia presenta a Axina1 como componente constitutivo en el complejo de degradación, ejerciendo un papel de regulador negativo de la vía, y a Axina2 como un elemento de expresión inducible con un potencial papel inhibidor por retroalimentación (Lustig et al, 2002). Por otro lado, axina es capaz de moverse entre el núcleo y el citoplasma gracias a sus secuencias NES y NLS (*Nuclear Export Signal* y *Nuclear Localization Signal*) pudiendo regular la localización celular de β -catenina junto a APC, aunque dados los bajos niveles de axina, la acumulación de β -catenina, puede llegar a sobrepasar los límites de regulación de axina en este sentido (Cong and Varmus, 2004).

GSK3 posee dos isoformas identificadas en mamíferos, α y β , de 51 y 47 kDa respectivamente, cuyos dominios quinasa comparten el 98% de identidad. Originalmente se describió GSK3 como regulador negativo de la síntesis de glucógeno, de modo que la inhibición de GSK3 lleva a la acumulación de la glucógeno sintasa (GS, *Glycogen synthase*) activa y, por tanto, facilita el paso de UDP-glucosa a glucógeno. De hecho, la inhibición de GSK3 β parece ser el principal método de regulación de GS (Revisado por Forde and Dale, 2007). La fosforilación de la Ser9 de GSK3 β inhibe la actividad de la enzima. Dicha fosforilación en el extremo N-terminal puede actuar como “sustrato” de la propia enzima ejerciendo una autoinhibición. Sin embargo, este residuo de serina sólo aparece conservado en metazoos, por lo que podría no resultar un mecanismo de regulación esencial (Forde and Dale, 2007). El hecho de que la fosforilación en Ser9 sea el evento regulador de GSK3 β en la vía WNT no está del todo claro. Algunos autores sostienen que dicha fosforilación, que correría a cargo de la

serina/treonina quinasa Akt, que inhibe a GSK3 β , siempre con la colaboración de DVL (Fukumoto et al, 2001). En cambio otros estudios no detectan fosforilación alguna de GSK3 β en Ser9, aunque sí documentan la inhibición de la enzima tras el correspondiente estímulo WNT (Ding et al, 2000; McManus et al, 2005). Existen trabajos que describen cómo la serina/treonina fosfatasa PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) sería capaz de liberar a GSK3 β de su inhibición inducida por la estimulación Wg (WNT). Este hecho indicaría que sería una fosforilación en serina la que regulase la actividad de la quinasa (Cook et al, 1996). Otro de los sitios de regulación descritos para GSK3 β sería la Tyr216, cuya fosforilación permite que la quinasa permanezca activa (Hughes et al, 1993).

CKI es la otra quinasa responsable de la fosforilación de β -catenina. Constituye una familia de serina/treonina quinasas monoméricas presentes en células eucariotas. En mamíferos se han descrito hasta 7 componentes: α , β , γ 1, γ 2, γ 3, δ y ϵ , cuyos dominios quinasa comparten una identidad de entre un 53 y un 98%. El sitio de fosforilación es pS/T-X-X-X-(S/T)*, siendo este último residuo el punto diana de fosforilación. A la vista de este esquema, CKI necesitaría de otra quinasa que ejerciese una fosforilación previa, pero se ha visto que en ciertos sustratos, como β -catenina, no se necesita dicho requisito (Revisado por Price, 2006). Cada una de las isoformas tiene diferentes proteínas diana, y por tanto, diferentes efectos. En la vía WNT, destacan CKI ϵ como regulador positivo y CKI α como regulador negativo. Sin embargo, existe una gran diversidad de trabajos que apuntan observaciones diferentes. Amit et al. (2002), sostienen que CKI α , ϵ y δ son capaces de fosforilar a β -catenina en presencia de axina. También se ha descrito como CKI ϵ es capaz de fosforilar a APC en sus repeticiones de 20 aminoácidos, lo que situaría a CKI ϵ como regulador negativo de la vía (Rubinfeld et al, 2001). Por otra parte, está ampliamente descrito como CKI ϵ es capaz de fosforilar a DVL, permitiendo con ello la regulación al alza de β -catenina (Hino et al, 2003; Bryja et al, 2007c). Recordemos también que CKI α , γ y ϵ han sido descritas como quinasas capaces de fosforilar al correceptor LRP6, favoreciendo así la activación de la interacción de LRP6 fosforilado con axina (Zeng et al, 2005; Swiatek et al, 2006; Davidson et al, 2005).

APC es una proteína codificada en el cromosoma 5q21-22 con múltiples dominios, capaz de interactuar con moléculas tan diversas como los componentes de la vía WNT, microtúbulos, reguladores del citoesqueleto (EB1 y IQGAP1) o Asef1 (factor intercambiador de nucleótidos de guanina). De todas las funciones que esta proteína puede desempeñar, sus interacciones con β -catenina (Rubinfeld et al, 1993) y los microtúbulos (Näthke et al, 1996) constituyen elementos esenciales debido a los cuales se ha definido la actividad supresora de tumores de esta proteína. Además de con β -catenina, APC interactúa y es fosforilado por GSK3 β en su región central, lo que a su vez permite una mejor unión de APC a β -catenina (Rubinfeld et al, 1996).

El gen de *APC* (Figura D) se distribuye a lo largo de 15 exones. El exón 9 posee un sitio de transcripción alternativo, dando lugar al denominado exón 9A en el que se delecionan las bases entre las posiciones 934-1236. En la proteína esto supone la pérdida de 101 aminoácidos. La proteína consta de 2844 aminoácidos (311.8 KDa). Entre sus múltiples dominios, APC posee un extremo N-terminal que permite la oligomerización de la proteína, 13 repeticiones Arm, 3 secuencias de 15 aminoácidos (1014-1210) por donde se une a β -catenina (Su et al, 1993), una región central con 7 repeticiones de 20 aminoácidos que conservan la estructura TPXXXFSXXXSXSL y, por último, el dominio C-terminal o básico por la profusión de argininas y lisinas en esta zona. Este último dominio es el de unión a los microtúbulos (Grodén et al, 1991; Revisado por Polakis 1997).

Dos tercios de las mutaciones descritas para *APC* afectan al marco de lectura de la proteína y el resto son mutaciones puntuales *nonsense*, pues las mutaciones *missense* son excepcionales. Se ha descrito que la distribución de las mutaciones germinales no sigue ninguna tendencia informativa. Sin embargo, las mutaciones somáticas tienden a localizarse en la región comprendida entre los aminoácidos 1280-1500. A esta región se la suele denominar como MRC o *Mutation Region Cluster*. Las mutaciones en esta región conllevan la formación de una proteína con el extremo C-terminal truncado (Revisado por Polakis, 1997; Aoki and Taketo, 2007; Bérout and Soussi, 1996).



Figura D. Esquema de la proteína APC. En el extremo N-terminal se localiza su dominio de oligomerización. Las tres repeticiones de 15 aminoácidos son el sitio de unión a β -catenina. El extremo C-terminal es el que suele aparecer truncado por mutaciones en procesos tumorales.

En el complejo de degradación interviene también una fosfatasa cuyo hipotético papel sería defosforilar los componentes de dicho complejo. PP2A ha sido mencionada en numerosos trabajos como un integrante más, sin embargo su papel como regulador positivo o negativo final sobre β -catenina no está claro. Así, PP2A se ha descrito como capaz de defosforilar a DVL2 (Yokoyama and Malbon, 2007). La subunidad catalítica junto con la subunidad estructural son capaces de unirse a axina, siendo dicho complejo capaz de defosforilar a axina y APC, actuando en este caso como reguladora positiva al desestabilizarse el complejo de degradación (Ikeda et al, 2000). La subunidad A, estructural de la enzima, sufre pérdidas de uno de sus alelos en el 55% de los casos de tumores de pulmón y colorrectales, calificándose como gen supresor de tumores (Wang et al, 1998).

Si toda esta maquinaria funciona adecuadamente, y no existe señal de estimulación, β -catenina, una vez fosforilada en los residuos previamente descritos, es conducida a su degradación en el proteasoma. Brevemente, las proteínas marcadas para su proteólisis llevan ligadas múltiples moléculas de ubiquitina. Para ello se sigue un proceso que implica a la enzima E1 activadora de la propia ubiquitina, E2, proteína transportadora de ubiquitina que recibe dicha molécula, y E3, que es la ubiquitin-ligasa responsable de ligar los residuos ubiquitina a las proteínas susceptibles de ser degradadas (Jentsch 1992). Así, una vez fosforilada β -catenina, es ligada a residuos de ubiquitina, siempre y cuando haya sido fosforilada en los sitios anteriormente descritos. Mutaciones o la falta de alguno de ellos traen como resultado el fracaso de la ubiquitinación de la proteína y, por tanto, su posterior degradación (Aberle et al, 1997). El sitio de reconocimiento de la β -Trcp, proteína del proteasoma, para β -

catenina, es su dominio de repeticiones WD-40. Por otro lado, β -Trcp también se une a Skp-1, otra de las proteínas del complejo de ubiquitinación (Liu et al, 1999).

En caso de que la cascada esté siendo estimulada por alguno de los ligandos WNT, se activa DVL y, finalmente, el complejo de degradación de β -catenina se desestabilizará. Los niveles de β -catenina irán en aumento acumulándose en citoplasma hasta su paso al núcleo donde activará la transcripción de genes diana. El transporte de β -catenina entre núcleo y citosol presenta ciertas discrepancias entre los distintos trabajos publicados. Para el transporte de proteínas entre núcleo y citosol, se emplea un sistema de receptores denominados importinas/exportinas o carioferinas, que interaccionan directamente con los complejos proteicos de los poros nucleares (NPC, *Nuclear Pore Complexes*). El sistema clásico de importación de proteínas consiste en un dominio rico en aminoácidos de tipo básico que constituye el NLS (*Nuclear Localization Signal*), que se une a las importinas α y β . Por el contrario los NES (*Nuclear Export Signals*) permiten la salida de proteínas. Se trata de un dominio rico en leucinas que es capaz de unirse al receptor CRM1 (exportin1/Xpo1) (Revisado Wiechens and Fagotto 2001). Sin embargo, β -catenina parece estar al margen de los NES/NLS, siendo capaz de entrar y salir del núcleo gracias a sus repeticiones Arm 10, 11 y 12, junto con su dominio C-terminal a través de los NPC (Koike et al, 2004). En su trabajo Wiechens y Fagotto apoyan esta hipótesis; sin embargo apuntan que β -catenina es capaz de salir del núcleo gracias a su extremo C-terminal sin necesidad de los últimos cinco dominios Arm (Wiechens and Fagotto, 2001). También hay grupos que afirman que β -catenina pasa al núcleo sin necesidad de NPC ni gasto alguno de energía (Suh and Gumbiner, 2003). Ahora bien, si β -catenina es apta para salir del núcleo por sí sola, las razones por las que esta proteína pueda acumularse en el núcleo podrían ser por un flujo de entrada mayor que de salida o incluso APC mutado podría estar reteniéndola dada su capacidad de unión a β -catenina (Eleftheriou et al, 2001). Siguiendo la misma línea, otros factores nucleares podrían estar impidiendo su salida, como *Xenopus*-TCF-3 (Wiechens and Fagotto, 2001). Puesto que APC puede retener β -catenina en el núcleo, se deduce que APC es capaz de pasar al núcleo. Además APC tiene dominios NES en su región N-terminal y central. Estos últimos parecen ser críticos en su exportación del núcleo y suelen ser los que se pierden cuando APC se trunca. APC usaría el CRM1 para

salir del núcleo, transportando a β -catenina. La incubación de LMB (*leptomycin-B*), inhibidor del receptor de exportación nuclear CRM1 sobre líneas celulares, inhibió el transporte de APC y con ello β -catenina se acumuló en el núcleo. Por otro lado las proteínas truncadas de APC que pierden los NES centrales, retienen cierta capacidad de unión a β -catenina, por lo que estaría causando doblemente su acumulación en el núcleo (Ki et al, 2006; Rosin-Arbesfeld et al, 2003; Neufeld, 2000).

B.1.4 En el núcleo: activación transcripcional de β -catenina

Una vez que β -catenina alcanza el núcleo puede activar la transcripción génica de sus genes diana, cuya lista al completo puede consultarse en <http://www-iceland.stanford.edu/~rnusse/WNTwindow.html>. Entre los principales genes diana destacan *ciclina D1*, *c-MYC* y *MMP-7* (*Matrix Metalloproteinase 7*). Sin embargo, β -catenina no se une directamente a la hebra de ADN, sino que lo hace a través de los factores transcripcionales LEF/TCF (*Lymphocyte enhancer factor-1/ T-Cell Factor*). En humanos se conocen cuatro genes de esta familia: *Lef1*, *TCF-1*, *TCF-3* y *TCF-4*. Estos factores transcripcionales pertenecen a la familia de proteínas HMG (*High Mobility group*), siendo a través de ese dominio por el que se unen a la hebra de ADN. (Revisado por Hurlstone and Clevers, 2002). Por sí solos son incapaces de iniciar la transcripción así que necesitan de otra proteína auxiliar, β -catenina en este caso. Se unen a ella a través de su dominio N-terminal, mientras que β -catenina se une a ellos con sus repeticiones tipo Arm, quedando su extremo C-terminal como dominio de transactivación (Behrens et al, 1996; Korinek et al, 1997). Primeramente se corroboró que los heterodímeros β -catenina/TCF/Lef1 interaccionaban entre sí y se localizaban en el núcleo (Behrens et al, 1996), siendo además capaces de incrementar la expresión en ensayos realizados con construcciones sintetizadas con dominios que responden a β -catenina/TCF (Korinek et al, 1997; Morin et al, 1997). El complejo TCF-4/ β -catenina elevaba la transcripción de *c-MYC*, mientras que dominantes negativos para TCF-4, disminuían dicha expresión (He et al, 1998).

La regulación de estos factores transcripcionales pasa por otras moléculas. Así, se ha descrito que Brg1 (*Brahma related gene-1*) es un elemento auxiliar de la

transactivación génica, capaz de aumentar la actividad β -catenina/TCF, por medio de interacción directa entre el dominio N-terminal de β -catenina y Brg-1, que a su vez recluta SWI/SNF o Rsc, agentes responsables del remodelado de la cromatina, indispensables por tanto para la transcripción génica (Barker et al, 2001). CBP/p300 son otros dos elementos auxiliares que se unen al extremo carboxi-terminal. Se trata de dos proteínas muy similares que se unen a β -catenina incrementando la actividad β -catenina/TCF (Hecht et al, 2000).

Por otro lado se sabe que los TCF pueden ser inhibidos por medio de fosforilación. Se ha descrito que TAK1, quinasa activada por TGF- β , que estimula a NLK (*Nemo Like Kinase*), fosforilando a TCF en presencia de β -catenina. Dicha fosforilación impide que el complejo β -catenina/TCF-P se una a las dianas de TCF (Ishitani et al, 1999).

Una importante familia de represores de TCF/Lef1 son las proteínas TLE/Groucho (*Transducin-like Enhancer of Split*). En humanos se han descrito tres genes, *TLE1*, *TLE2* y *TLE3*. Estructuralmente, la proteína consta de un dominio N-terminal rico en glutamina, denominado dominio Q. A continuación están los dominios GP (glicina-prolina), CcN (*CKII site/cdc2 kinase/NLS motif*) y SP (serina-prolina). El dominio C-terminal lo constituye el denominado WD40 por contener cuatro repeticiones de 40 residuos aminoácidos muy conservados (Stifani et al, 1992). Se cree que su mecanismo de acción consiste en la unión indirecta de TLE al ADN a través de algún factor transcripcional. TLE polimeriza en un homotetrámero por su dominio WD40, y de esta manera es capaz de reclutar factores modificadores de la cromatina como la histona deacetilasa Rpd3, manteniendo silenciada la estructura de la cromatina (Chen and Courey, 2000). En cuanto a su relación con β -catenina, se ha visto que el dominio Q de TLE1 competiría con ella en su unión a Lef1 (Daniels and Weis, 2005).

Una vista global de toda la cascada de activación anteriormente descrita puede verse en las Figuras E y F.

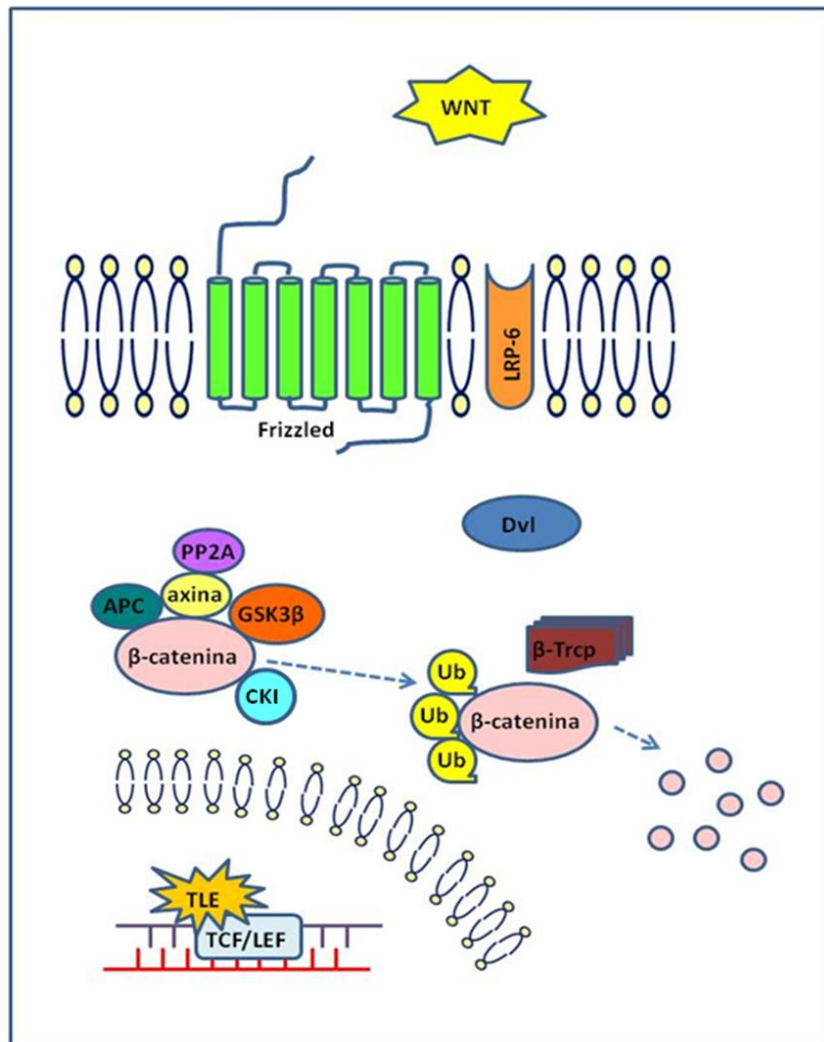


Figura E. Esquema de la vía WNT sin estimulación. Cuando los ligandos WNT no se unen a sus receptores correspondientes, el complejo de degradación (Axina, APC, CKI, GSK-β) fosforila a β-catenina en los residuos 33, 35, 41 y 47. Esto marca a la proteína señal para su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma. Mientras tanto, en el núcleo, la transcripción se encuentra reprimida debido a la unión de las proteínas TLE sobre los cofactores TCF/LEF.

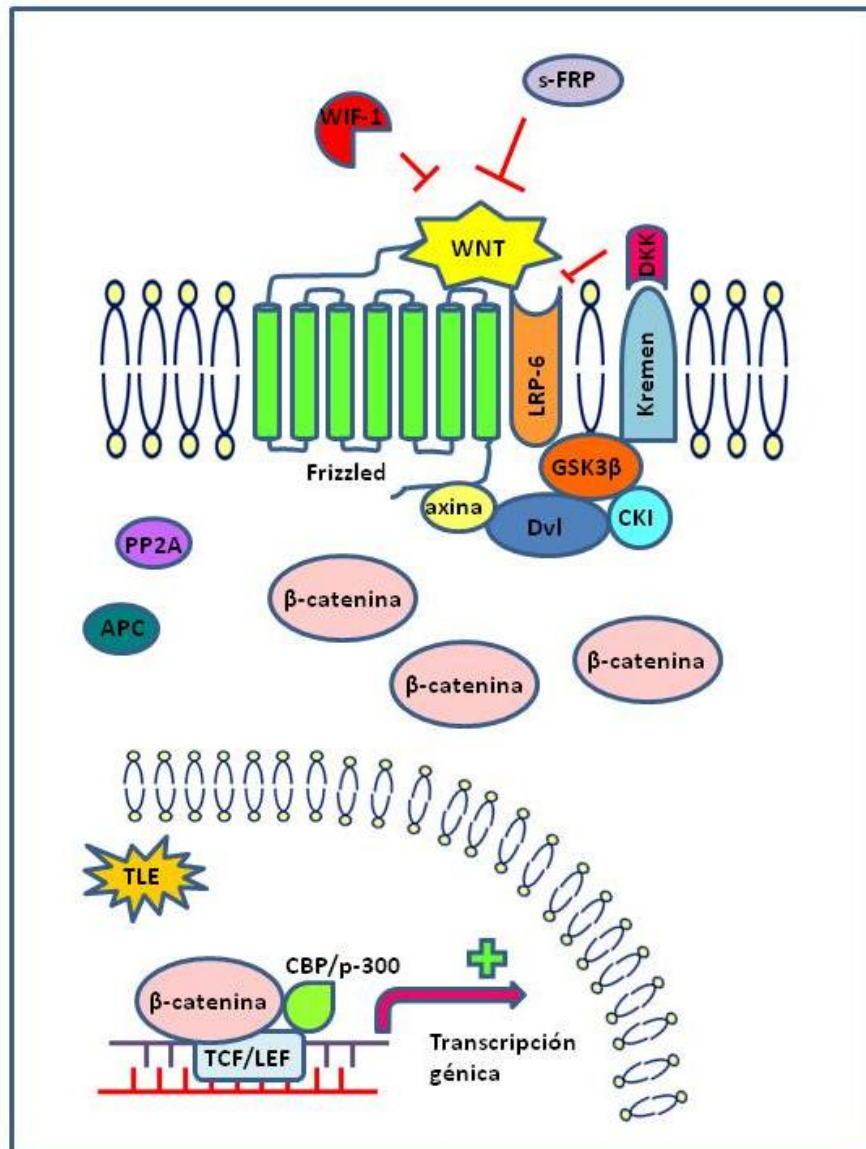


Figura F. Esquema de la vía WNT activada por ligandos WNT. El ligando se une a los receptores Fz y LRP-6. Dicha interacción provoca el movimiento hacia la membrana plasmática de DVL fosforilado y axina. Por otro lado, GSK3β y CKI fosforilan a LRP-6, lo que favorece su unión a axina. El resultado de este sistema es la destrucción del complejo de degradación, por lo que β-catenina deja de ser degradada y se acumula en el citoplasma. Esto permite su paso al núcleo, donde desplaza a los represores transcripcionales, TLE, y se une a los cofactores TCF/LEF, iniciándose la transcripción de los genes diana. En el exterior de la célula, se destacan algunos de los elementos de inhibición de la vía más destacados como son WIF1, s-FRP y Dkk, ligando de Kremen, que formaría complejo con LRP-6 induciendo su internalización.

B.2 VÍA WNT NO CANÓNICA

En los diferentes estudios que se han llevado a cabo sobre los distintos ligandos y receptores *Frizzled*, se observó que algunas de las combinaciones no daban lugar a la estimulación del eje β -catenina/TCF-Lef1. Aquí se hace patente la versatilidad correspondiente a las diferentes posibilidades de unión ligando WNT/receptor. De hecho, la inyección de ARNm de *XWNT5a* en embriones de pez cebra (*Zebrafish*) provocó la liberación de los reservorios de calcio intracelular, mientras que *XWNT8* no produjo tal evento (Slusarski et al, 1997). Éste fue el primer trabajo que mostraba evidencias de un segundo tipo de mensajeros que generaban una activación independiente de β -catenina. La estimulación con el *XWNT5a* producía un fenotipo parecido al que se genera al sobreexpresar el receptor 5HT1c de serotonina, que induce también la liberación de calcio de los reservorios internos de forma dependiente de proteínas G. Posteriormente, se demostró que la liberación del calcio intracelular venía seguido de la activación de la proteína quinasa C, PKC, que se traslocaba a la membrana y de la proteína quinasa II dependiente de calmodulina y calcio, CamKII (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II), ambas dependientes también de la proteína G (Sheldahl et al, 1999; Kühl et al, 2000a). A raíz de esta diversificación, algunos autores proponen clasificaciones de los receptores en función de los eventos posteriores que desencadenan. Así Kühl et al, clasifican a los receptores en dos grandes grupos: Rfz2, Mfz3, Mfz4, Mfz6, que activan CamKII y PKC; y Rfz1, Mfz7, Mfz8, Hfz5 que activan β -catenina. Este último grupo lo subdividen a su vez en: Hfz5, fz8 en ratón y *Xenopus*, que tras estimulación con *XWNT5a* inducen ejes ectópicos y no promueven la traslocación de DVL a la membrana, si bien no se ha descrito la capacidad de activar CamKII y PKC en los casos de Hfz5 y Xfz8; y Rfz1 y Mfz7 que sí promueven la traslocación de DVL (Kühl et al, 2000b). Otra observación a tener en cuenta depende del ligando que actúe. Así los ligandos Wnt1, Wnt3a y Wnt7a se consideran de alta capacidad de transformación, Wnt2, Wnt5b y Wnt7b, de capacidad transformante media, mientras que Wnt4 y Wnt5a tienen baja capacidad de transformante (Weeraratna et al, 2002).

La conclusión evidente que se sacó de esos primeros trabajos es que aparte de lo que se conocía como vía WNT o vía WNT canónica, existían otras alternativas, WNT- Ca^{2+} y PCP. La vía WNT- Ca^{2+} involucra a las proteínas G, caracterizadas por formar heterotrímeros. En este caso, los ligandos inducen la activación de la cascada inositoltrifosfato (IP_3)- Ca^{2+} . Esto activaría a la fosfatasa calcineurina y en último término al factor transcripcional NF-AT, induciendo señales de ventralización. NF-AT regularía de forma negativa a la vía WNT canónica, actuando en algún punto entre DVL y β -catenina (Saneyoshi et al, 2002).

La vía PCP contribuye a la orientación de las células en el propio plano del epitelio y en relación al eje proximal o distal de un órgano. En esta tercera vía relacionada con los receptores Frizzled, participan las proteínas Rho y JNK (*Jun-N-Terminal Kinase*). El punto de regulación entre la vía WNT canónica y PCP es DVL. Se cree que CKI y Nkd (*Naked*) son las proteínas responsables de actuar regulando a DVL. La fosforilación de DVL por CKI favorece la activación de la señal WNT canónica. Naked, es otra proteína capaz de unirse a DVL de forma que inhibe la señal clásica pero induce la activación de JNK (Yan et al, 2001). También se ha descrito una tercera molécula que podría estar intercediendo en la regulación de la activación WNT canónica-PCP a nivel de DVL. Se trata de Strabismus (Stbm) y es una proteína transmembrana que actuaría activando la señal PCP (Park and Moon, 2001; Revisado por Axelrod, 2002). No obstante Stbm se ha visto que puede regular también de forma negativa la vía PCP (Klein and Mlodzik, 2005; Mlodzik 2002). Diversina, proteína de la cascada PCP, actúa a nivel citoplasmático donde es capaz de inhibir la vía WNT canónica, y en el núcleo, donde se une al cofactor transcripcional AF9. Así que Diversina estaría implicada en la transcripción génica de PCP (Haribaskar et al, 2009).

La Figura G recoge de forma esquemática las moléculas implicadas en las dos rutas no canónicas descritas previamente.

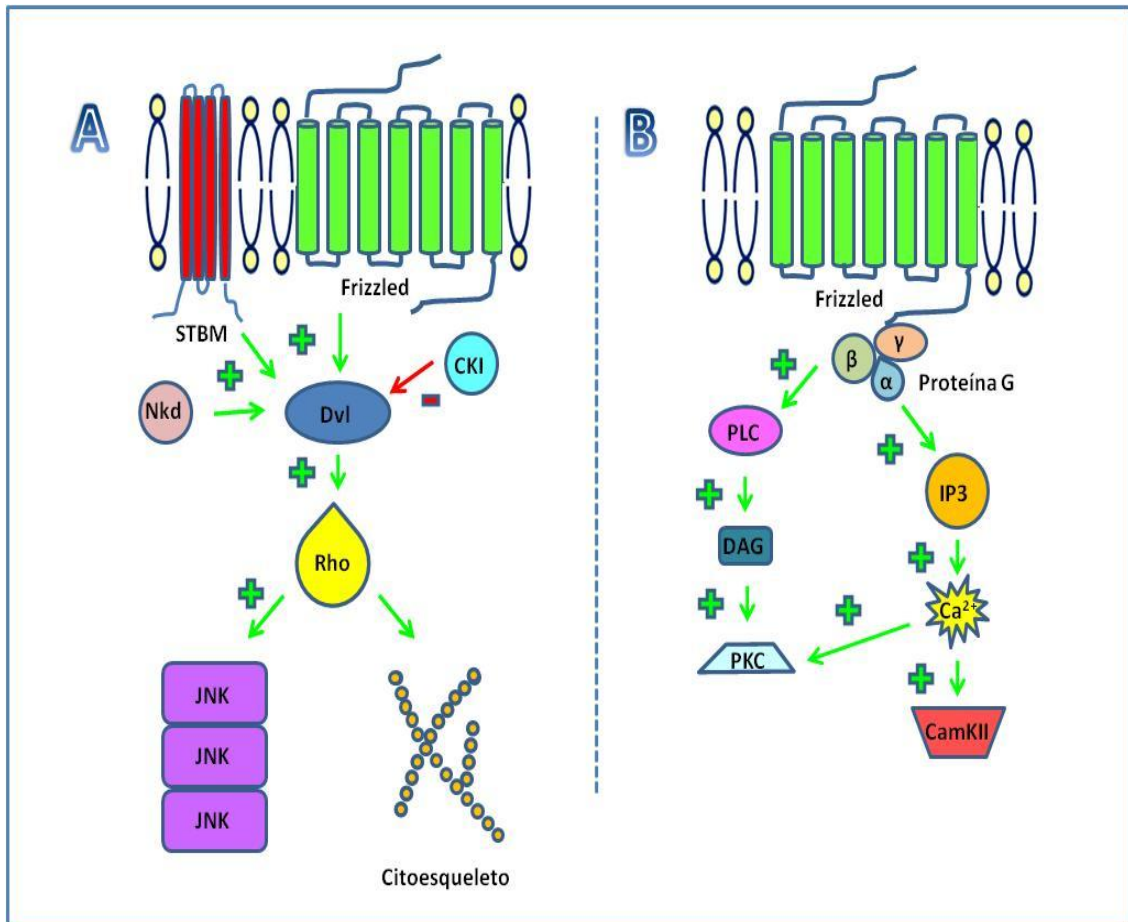


Figura G. Esquema de las dos vertientes no canónicas de la vía WNT. A) La estimulación de los receptores Fz en la PCP conlleva la activación de las enzimas Rho y JNK. Esta vía regula la polarización de las células. B) La vía WNT- Ca²⁺ actúa a través de proteínas G, liberándose los reservorios celulares internos de calcio, activándose en último término la fosfatasa calcineurina (Modificado Peifer and McEwen, 2002).

B.2 WNT Y CÁNCER

El año 1982 constituyó el primer hito destacable en el conocimiento de la vía WNT y su implicación en cáncer, pues se descubrió el protooncogen *Int-1* asociado con tumores en la glándula mamaria (Nusse and Varmus 1982). Posteriormente *Int-1* daría lugar a lo que hoy conocemos como los ligandos WNT. Por otro lado, mutaciones en *APC* fueron encontradas en pacientes con FAP (Nishisho et al, 1991) y en el 85% de los pacientes con cáncer colorrectal esporádico (Kinzler and Vogelstein, 1996). De hecho se detectaron mutaciones truncantes en *APC* en ambos tipos de pacientes, aunque una sola mutación del gen no es suficiente para el desarrollo de los pólipos y siempre es

necesario un segundo evento. APC es a su vez esencial para la vía WNT pues es capaz de unirse a β -catenina (Su et al, 1993, Rubinfeld et al, 1993) influyendo en su regulación a nivel del complejo de degradación como hemos visto anteriormente. La bibliografía apunta que la estabilización de β -catenina es un evento temprano en la carcinogénesis (Bienz and Clevers, 2002). De hecho, se tiene constancia desde hace tiempo de que la mera introducción de la región central de APC por donde ancla β -catenina es suficiente para reducir los niveles de esta última (Munemitsu et al, 1995) y con ello reducir su potencial transcripcional. La capacidad tumorigénica de APC estaría relacionado con su capacidad de regular el complejo β -catenina/ TCF-4 (Korinek et al, 1997; Morin et al, 1997). En el mismo sentido, líneas celulares de cáncer de colon con mutaciones en APC, contienen altos niveles de β -catenina y favorecen la formación del complejo β -catenina-TCF (Bienz and Clevers, 2000; Korinek et al, 1997).

β -Catenina es a su vez diana de alteraciones que favorecen la activación de la vía WNT. Se han descrito delecciones y mutaciones en el exón 3 del gen (Liu et al, 2002; Shimizu et al, 2002; Mirabelli-Primdahl et al, 1999, Iwao et al, 1998; Sparks et al, 1998) que permitirían a β -catenina “escapar” del control del complejo de degradación. Se ha descrito que los tumores que albergan anomalías en el gen de APC no desarrollan mutaciones en β -catenina (*CTNNB1*) y viceversa (Behrens and Lustig, 2004), si bien las mutaciones en APC serían poco frecuentes en cánceres colorrectales esporádicos MSI-H, siendo sustituidas por mutaciones en *CTNNB1* (Sparks et al, 1998). Algunos autores (Polakis, 2009) afirman que aunque ciertos trabajos relacionen las mutaciones de β -catenina con tumores MSI-H, estudios posteriores no lo confirmarían (Løvig et al, 2002), estando en todo caso asociadas a pacientes con HNPCC.

Axina2 o *conductina* es un gen que codifica para una de las dos isoformas de axina que se expresan en humanos. Sobre este gen se han descrito alteraciones en repeticiones mononucleotídicas de su secuencia (Thorstensen et al, 2005). Además se ha descrito una hipermetilación del promotor en tumores con alta inestabilidad en microsatélites que favorecería el crecimiento celular, siendo un gen relevante en la tumorigénesis (Koinuma et al, 2006).

A grandes rasgos, estos serían los principales componentes descritos con mutaciones relacionados con la vía WNT en tumores colorrectales. Pero existen otras muchas moléculas cuya función es reguladora, sobre las que se han referido modificaciones. En cuanto a regulación epigenética, la bibliografía detalla silenciamiento de promotores por hipermetilación en *SFRP* (Suzuki et al, 2004) y en *DKK* (Sato et al, 2007; Aguilera et al, 2006) en tumores colorrectales primarios y líneas celulares de cáncer de colon. *WIF1* también muestra niveles bajos de expresión por hipermetilación del promotor en los mismos casos, evento considerado a su vez como temprano en la carcinogénesis (Taniguchi et al, 2005). Estos tres componentes han sido clasificados como reguladores negativos de la vía WNT.

Por otro lado se han descrito alteraciones tanto por mutación como por pérdida de heterozigosidad en el gen *PPP2R1B*, que codifica para la subunidad A reguladora de la fosfatasa PP2A (Ruediger et al, 2001; Wang et al, 1998). El cofactor transcripcional *TCF-4* también presenta alteraciones en secuencias repetitivas en tumores colorrectales MSI-H y líneas celulares de cáncer de colon (Shimizu et al, 2002; Duval et al, 1999). *WNT5a* puede tener hipermetilación del promotor en tumores colorrectales primarios y líneas celulares. Su expresión endógena en líneas celulares, redujo el crecimiento clonal, favoreció la degradación de β -catenina y se disminuyó la expresión de ciclina D1, diana de la vía WNT (Ying et al, 2008). A su vez, *FBXW7*, gen que codifica para una proteína que ubiquitina c-Myc y ciclina E, presenta baja expresión en muestras de tumores colorrectales primarios en comparación con tejido normal. Este hecho además se relacionó con características clínicas de peor pronóstico (Iwatsuki et al, 2009).

C. E-CADHERINA Y VÍA WNT

E-cadherina, o cadherina epitelial, pertenece a la familia de receptores dependientes de calcio relacionados con la adhesión célula-célula, constituyendo uno de los más importantes sistemas físicos de adhesión intercelular. La interacción que desempeña es de tipo homofílico y depende de su dominio N-terminal para determinar su especificidad. Dicho dominio N-terminal constituye el ectodominio de la

proteína y posee cinco repeticiones de 110 aminoácidos que comparten propiedades con los dominios tipo inmunoglobulina. Posee un solo dominio transmembrana y por último un dominio C-terminal citoplasmático, altamente conservado, por donde interacciona en último término con los filamentos de actina. La interacción de E-cadherina con el citoesqueleto es esencial para su función de unión celular. La pérdida del dominio citoplasmático aún cuando esté presente el extracelular, perjudica su función de adhesión célula-célula (Revisado por Takeichi, 1991). Además de con la adhesión celular, esta proteína está relacionada con la transición epitelio-mesénquima (EMT). La pérdida de E-cadherina representa un papel importante en este proceso. Se sabe que la expresión de represores de E-cadherina se encuentra incrementada en células tumorales, y que dicha expresión desciende en caso de que existan mutaciones en E-cadherina. Ambas situaciones favorecerían la invasión y metástasis del tumor (Laux et al, 2004).

En cuanto a su función en adhesión celular, para la interacción con el citoesqueleto de actina, necesita interaccionar con otras proteínas intermedias pertenecientes al grupo de las cateninas. Así, E-cadherina se une a β -catenina a través del dominio C-terminal de la primera, y de las repeticiones en Arm de la segunda. A continuación α -catenina se une a β -catenina por el dominio N-terminal de ésta. α -Catenina se uniría a continuación con los filamentos de axina (Hülsken et al, 1994; Rubinfeld et al, 1995). Sin embargo, β -catenina, con el resto de proteínas implicadas, también se une a APC por los mismos dominios con los que interacciona con E-cadherina. Dichas interacciones son, por lo tanto, mutuamente excluyentes (Rubinfeld et al, 1995). En este sistema de adhesión, se ha visto que γ -catenina o plakoglobina es capaz de sustituir a β -catenina, e incluso puede ejercer el mismo papel en la unión con APC (Hülsken et al, 1994; Rubinfeld et al, 1995). Por otro lado, APC se ha detectado que colocaliza con los microtúbulos en los márgenes de membranas no involucradas en el contacto célula-célula. Este hecho se ha relacionado con la migración celular. De esta manera, APC podría estar compitiendo con E-cadherina por β -catenina, reduciendo la disponibilidad de la misma para la adhesión y potenciándose la migración celular (Kadowaki et al, 1994; Näthke et al, 1996), siempre que ninguna otra catenina pueda suplir su papel.

La implicación de β -catenina en la función de adhesión de E-cadherina y la función de β -catenina en la vía WNT abre la posibilidad de una regulación de E-cadherina sobre la actividad de β -catenina. Así, se ha descrito que la pérdida de E-cadherina, favorece la unión de β -catenina a Lef-1, proteína con la que es capaz de formar otro complejo excluyente en relación con E-cadherina. En la línea celular humana de cáncer de colon SW480, que no posee E-cadherina endógena, la expresión de la misma de forma exógena redujo la presencia de β -catenina nuclear y de su actividad transcripcional en un 90% de los casos. Además, cuando se procedía a la estimulación de la vía WNT, la inhibición del complejo de degradación y consecuente incremento de β -catenina sobrepasaban la capacidad de unión por parte de E-cadherina (Orsulic et al, 1999). En otro trabajo sobre la misma línea celular, se observó una disminución en la tasa de crecimiento celular concomitante a la expresión de E-cadherina, relacionándose tal evento con la reducción de la señal β -catenina/TCF. Sin embargo, la expresión de E-cadherina no redujo los niveles citoplasmáticos ni nucleares de β -catenina (Gottardi et al, 2001). Estos autores proponen que solo una pequeña fracción de β -catenina, que denominan activa, estaría disponible bien para su unión a E-cadherina, bien a TCF. Por otro lado, se ha visto que la ausencia de E-cadherina, sólo implica un incremento de β -catenina citosólica siempre que vaya acompañada de la activación de la señal WNT (Herzig et al, 2007). Sin embargo, en este trabajo los autores coinciden en que la expresión de E-cadherina favorece la formación del complejo de adhesión y reduce el fenotipo invasivo del modelo celular, estabilizando β -catenina en la membrana. Recientemente se ha descrito otro punto común de la regulación E-cadherina/ β -catenina. El represor transcripcional de E-cadherina, Snail, es capaz de coactivar los genes diana de la vía WNT en presencia de β -catenina, si bien dicha actividad parece ser independiente de la capacidad de represión de Snail sobre el promotor de E-cadherina (Stemmer et al, 2008). Por otro lado, c-Myc, conocida diana de β -catenina/WNT, actúa como activador transcripcional de E-cadherina a través de AP-2 (Batsché et al, 1998).

D. METALOPROTEASAS Y MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

D.1 METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular (ECM, *ExtraCellular Matrix*) constituye una barrera física a la invasión celular. El correcto funcionamiento de las vías que regulan su morfogénesis, desarrollo, daño tisular y remodelación es esencial para la homeostasis de la misma. Sin embargo, cuando se detecta algún tipo de alteración en dicha regulación, éstas se relacionan con enfermedades como la artritis, fibrosis... y el cáncer.

Las metástasis constituyen una de las principales causas clínicas de muerte en pacientes afectados por cáncer. Sin embargo los factores celulares y bioquímicos implicados en este proceso no son del todo conocidos, siendo por ello necesario un mayor número de estudios en este sentido (Munshi and Stack, 2006). La actividad proteolítica desempeña un papel esencial en la ruptura de uniones intercelulares, que favorecen así los procesos de invasión y metástasis. De entre el abigarrado panel de proteasas capaces de romper moléculas de matriz extracelular y de adhesión, las metaloproteasas (MMPs) son las más destacadas. Las metaloproteasas o matrixinas son unas enzimas dependientes de zinc de las que se conocen 24 genes codificantes en humanos. Se sabe que existe un gen que duplica la codificación para *MMP-23*, por lo que existen 23 enzimas metaloproteasas (Nagase et al, 2006).

Al pertenecer a una familia, poseen una serie de dominios que comparten y por los que suelen tener solapamientos en cuanto a la especificidad de sustrato. Las MMPs se sintetizan como prepro-enzimas y se secretan como pro-enzimas inactivas en la mayoría de los casos. El péptido señal es el que dirige a la enzima a su vía de secreción. Por otro lado, el dominio del propéptido se constituye de unos 80 aminoácidos y su secuencia suele seguir el patrón PRCG(V/N)PD. Este dominio ocupa el sitio de unión a zinc gracias a su residuo de cisteína, lo que supone un impedimento a la accesibilidad del centro activo de la enzima (*Cystein switch*). El dominio catalítico, de unos 170

aminoácidos, donde se encuentra el centro de unión a zinc (VAHExgGHXXGXXH) posee tres histidinas que junto al ión zinc coordinan el centro activo. Además de su unión a zinc, se unen a dos cationes calcio que favorecen la estabilidad de su actividad enzimática. Las enzimas MMP-2 y MMP-9 cuentan con tres repeticiones del dominio de unión a fibronectina tipo II que favorecen su interacción con colágenos y gelatinas. A continuación existe un dominio “bisagra” o de unión (*linker*) que sirve como medio de asociación al dominio de interacción/especificidad al sustrato o dominio hemopexina. Este último dominio, requisito esencial de las colagenasas, cuenta con unos 200 residuos aminoacídicos. Las MMPs de membrana contienen a su vez unos 20 aminoácidos adicionales como dominio transmembrana y una pequeña cola citoplasmática (Revisado Zucker and Varcica 2004, Nagase and Woessner, 1999). La Figura H muestra un esquema de los dominios proteicos aquí descritos.

Basándose en la presencia o no de los diferentes motivos, las MMPs pueden clasificarse en: colagenasas (MMP-1, MMP-13), gelatinasas (MMP-2, MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11), matrilisinas (MMP-7, MMP-26), MMP tipo transmembrana (MMP-14, -15, -16 y -24), además de otras no clasificadas en un grupo en concreto por su versatilidad en cuanto a estructura y localización cromosómica (Revisado Nagase et al, 2006).

El conjunto de estas enzimas presenta una actividad basal no muy elevada y sus niveles de transcripción están estrictamente regulados positiva y negativamente por moléculas como citoquinas, factores de crecimiento como TGFs (*Transforming Growth Factors*) o TNF α (*Tumor Necrosis Factor alpha*). Incluso las interacciones célula-matriz o célula-célula son capaces de modular la transcripción de las MMPs. No hay que olvidar que existe otro nivel de regulación en cuanto a su activación enzimática por modificación post-transcripcional que requiere la eliminación del propéptido del extremo N-terminal de la proteína.

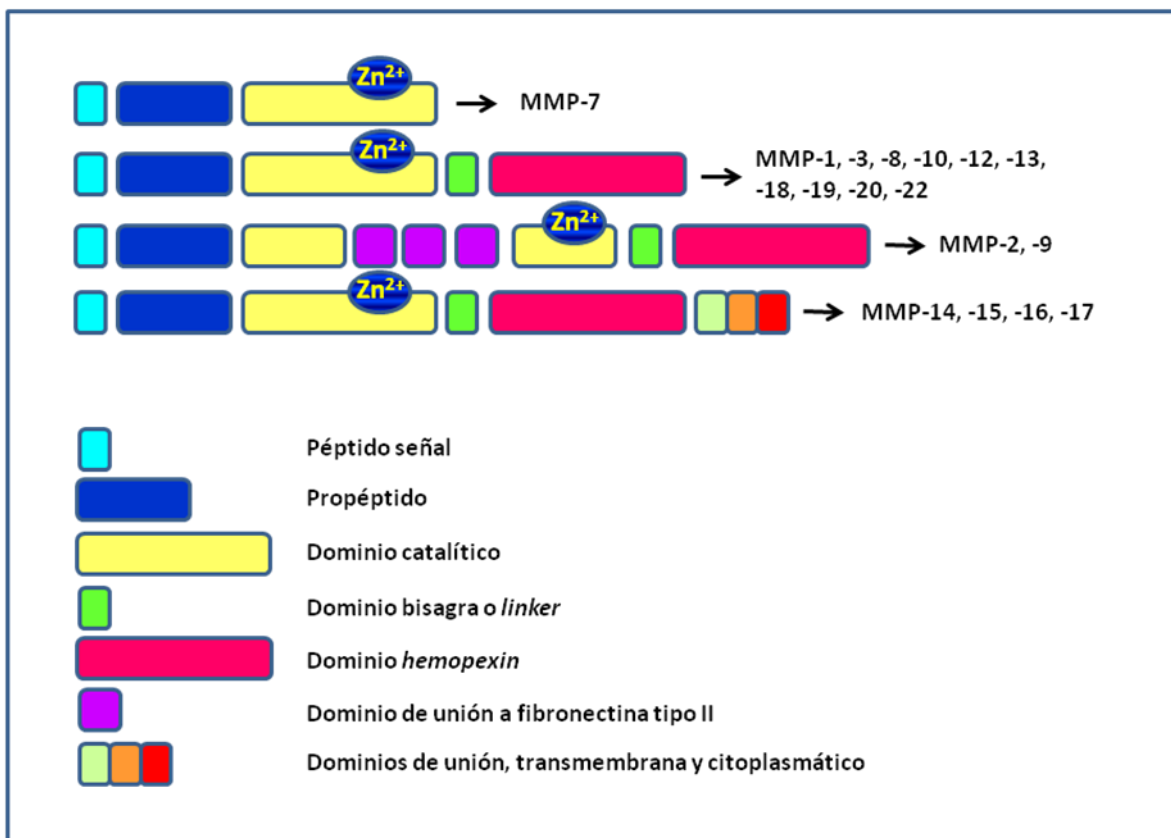


Figura H. Dibujo esquemático de los principales dominios de las MMPs. A continuación de cada representación están los nombres de las enzimas que contienen dichos dominios. Como se aprecia, la más sencilla en cuanto a estructura es la MMP-7. El resto de las MMPs presentan dominios adicionales. Adaptado *Nagase and Woessner, 1999*.

Especial mención merecen los inhibidores de MMPs específicos de tejido (TIMPs, *Tissue Inhibitors MMP*) de los que se conocen cuatro miembros (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4). La regulación transcripcional de estas proteínas está también a cargo de citoquinas y factores de crecimiento que también controlan la expresión de las MMPs. Normalmente, la concentración de TIMPs en los tejidos y fluidos extracelulares, excede la concentración de las propias MMPs, por lo que limita la actuación de las mismas a sitios pericelulares (Zucker and Varcica, 2004).

La estructura de los TIMPs consiste en 184-194 aminoácidos, divididos en los extremos N- y C-terminal. Cada dominio contiene tres uniones disulfuro conservadas. Además el extremo N-terminal posee la actividad inhibitoria sobre las MMPs. El mecanismo de inhibición se basa en que la estructura tridimensional de los TIMPs en

forma de cuña, les permite introducirse en la región catalítica de las MMPs. El catión Zn^{2+} es entonces quelado por el residuo carbonilo de la cisteína en posición 1 y el residuo amino N-terminal (Gomis-Rüth et al, 1997).

Otro inhibidor endógeno principal es la α_2 -macroglobulina. Esta proteína se encuentra en plasma y forma homotetrámeros. Cada una de las subunidades tiene un peso de 180 kDa. Su mecanismo de acción se basa en atrapar a la propia MMP en su dominio globulina y, a continuación, tras su interacción con el receptor LRP-1 (*Low density lipoprotein receptor-Related Protein-1*), el complejo sufre endocitosis (Nagase et al, 2006, Strickland et al, 1990).

D.1.1 MMPs: Implicación en cáncer

La familia de las MMPs es capaz de degradar todos los componentes de la ECM: colágenos, lamininas, fibronectinas, vitronectinas, enactinas, proteoglicanos,... Así, las MMPs aparecen implicadas en multitud de procesos fisiológicos y patológicos en los que esté involucrada su actividad proteolítica. Se ha descrito por ejemplo que MMP-2 y MMP-9 actúan tras el infarto de miocardio participando en la remodelación del tejido dañado por la isquemia sufrida. Así la inhibición de MMP-2 reduce la ruptura cardíaca que suele acontecer tras los infartos de miocardio, mientras que la pérdida de MMP-9 reduce la zona infartada y el porcentaje de infiltración de neutrófilos tras la reperusión (Hayashidani et al, 2003; Romanic et al, 2002). Pero las MMPs están incluidas en muchos otros procesos fisiológicos como la diferenciación y la apoptosis, y patológico como la inflamación, artritis y la metástasis tumoral (inflamación, diferenciación, apoptosis,...) destacando entre ellos la metástasis tumoral.

En cáncer colorrectal, han sido muy estudiados diversos miembros de esta familia. MMP-1 está implicada en un peor pronóstico al favorecer metástasis hematógenas (Sunami et al, 2000). También se ha descrito una significativa mayor expresión de MMP-13 en tumores colorrectales de peor pronóstico frente a aquellos de mejor pronóstico (Leeman et al, 2002). La expresión de *MT1-MMP* y *MMP-14* es

elevada en tumores de colon y se ha descrito como diana de la vía WNT (Takahashi et al, 2002).

MMP-2 está relacionada con la invasión tumoral y se ha visto que existe una mayor expresión de su transcrito en el frente invasivo de tumores CRC. En células T, se consigue la inducción de *MMP-2* y *MMP-9* tras su incubación con WNT1 y WNT3a. Ambas son dianas de β -catenina y presentan sitios de unión a LEF/TCF (Wu et al, 2007). Se plantea a MMP-2 como marcador molecular de metástasis hepáticas junto con TGF α e IGF-II (Barozzi et al, 2002).

En un trabajo previo de nuestro grupo (Morán et al, 2002), se demostró que la expresión de *MMP-3* en tumores CRC MSI-L/MSS era mayor que en tumores MSI-H, donde además los niveles de MMP-9 activa eran menores, posiblemente debidos a una menor síntesis de MMP-3. Por otro lado se ha constatado que el polimorfismo A₅/A₆ en la posición -1612 en el promotor de *MMP-3* está relacionada con un mayor riesgo de desarrollo de pequeños adenomas en pacientes con cáncer colorrectal (Lièvre et al, 2006). A su vez, el polimorfismo A₅/A₆ en -1171 guarda una relación significativa con la generación de metástasis en ESCC (*Esophageal Squamous Cell Carcinoma*) (Zhang et al, 2004).

La expresión en tejido normal de MMP-7 o matrilisina parece presentar diferencias entre trabajos que sí detectan su expresión en muestras de tejido de cáncer de colon y recto (Fang et al, 2009; Luo et al, 2005), frente a aquellos trabajos en los que no detectan tal expresión (Kirimlioglu et al, 2006). Sin embargo sí existe consenso en cuanto a su presencia en relación con metástasis nodales y distales, además de su implicación en el desarrollo y progresión de CRC. De hecho se le considera un marcador tumoral de metástasis hepáticas y de peor pronóstico en tumores de colon (Fang et al, 2009). MMP-7 aparece sobreexpresado en tejido tumoral (Kirimlioglu et al, 2006). Especialmente, se demuestra su mayor presencia en estadios avanzados tipo C y D, y en el frente invasivo del tumor (Luo et al, 2005; Ougolkov et al, 2002; Brabletz et al, 1999). Por tanto MMP-7 está relacionado con invasión y metástasis en cáncer de colon, además con una correlación positiva en cuanto a su

expresión con β -catenina (Ougolkov et al, 2002). De hecho, es conocido que *MMP-7* es diana de la vía WNT, puesto que posee secuencias de unión a TCF-4 (Brabletz et al, 1999) en su promotor, que responden a la presencia de β -catenina. Con todo, existen otras moléculas encargadas de dicha regulación como k-ras que podría estar ejerciendo un papel sinérgico con la vía WNT (Brabletz et al, 1999).

Por otro lado, *MMP-7* tiene como uno de sus sustratos a una de las moléculas más destacadas en adhesión, la E-cadherina. La proteólisis de E-cadherina por parte de *MMP-7*, favorece la migración y reorganización de los contactos célula-célula en epitelio pulmonar dañado (McGuire et al, 2003). La secreción apical de *MMP-7* por tejidos intactos va dirigida a dianas específicas, mientras que en la secreción basolateral en tejidos afectados, la matrilisina actúa sobre diferentes proteínas (McGuire et al, 2003).

D.2 INTEGRINAS

Se trata de una familia de glicoproteínas transmembrana que actúan como receptores mediando interacciones célula-matriz. Se componen de dos subunidades, una α y una β que transducen la señal que reciben como receptor. Se conocen un total de 18 subunidades α y 8 subunidades β que se combinan hasta formar un total de 24 moléculas de adhesión celular (CAM, *Cell Adhesion Molecule*) (Paschos et al, 2009; Yilmaz and Christofori, 2009; Wipff and Hinz, 2008). En 12 de esas CAM se ha detectado la presencia de la subunidad $\beta 1$ (Paschos et al, 2009).

Los heterodímeros de integrinas pueden conducir distinto tipo de señal en función de que el ligando se una a ellas cuando están de forma aislada o si están formando pequeños agregados, situación por la cual se inician respuestas mediadas por la activación de eventos a través de tirosina quinasas. Además se trata de receptores de membrana que transmiten señales bidireccionalmente, esto es, de fuera hacia el interior celular y viceversa (Paschos et al, 2009). Por otro lado ejercen funciones de adhesión de forma mecánica y son capaces de regular el movimiento celular y su direccionalidad (Jiang et al, 2009; Yilmaz and Christofori, 2009). De este

modo, las integrinas contribuyen a la formación de estructuras adhesivas mediante las cuales la célula es capaz de unirse a un sustrato inferior, hecho que permite que la F-actina, forma activa de esta proteína, se contraiga y genere la suficiente tensión para que la célula avance. Durante este proceso de migración celular, las integrinas sufren el mismo proceso de endocitosis/exocitosis que experimentan las cadherinas. Así las integrinas controlan numerosos eventos celulares como la organización del citoesqueleto de actina en sitios de adhesión a la matriz extracelular, dirigen la señalización de moléculas de la familia de pequeñas GTPasas (*Rho family*), regulan el recambio y remodelación de complejos de adhesión activando FAK (*Focal Adhesion Kinase*) y la tirosín quinasa Src, regulan señales de crecimiento, división, diferenciación y adhesión celular, etc. La regulación de la familia Rho por parte de las integrinas lleva implícita la regulación de otras quinasas como ERK (*Extracellular signal Regulated Kinase*), PAK (p21-Activated Kinase) y JNK (*c-Jun NH2-terminal Kinase*), enzimas implicadas en la regulación de expresión génica y ciclo celular. Estas moléculas a su vez fosforilan y regulan complejos de adhesión. (Revisado por Munshi and Stack 2006; Martin et al, 2002). A parte de FAK y Src como dianas directas de las integrinas, se encuentran otras moléculas como GSK3 β y PI3K o AKT (Yilmaz and Christofori, 2009). Los efectores de éstas son las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), factor de necrosis tumoral (NF κ B) y β -catenina. Todas ellas moléculas de sobrado implicación en relación a procesos de proliferación, supervivencia, migración e invasión.

Como ya se había señalado anteriormente, las integrinas son capaces de regular la expresión y activación de diversas MMPs. Así, por ejemplo, el heterodímero $\alpha\beta 6$ induce la secreción de MMP-9 (Yang et al, 2008). De hecho, en este trabajo se relaciona la expresión de la integrina $\alpha\beta 6$ con metástasis hepáticas en cáncer colorrectal y afirma que su expresión favorece a su vez, la supervivencia en el hígado de células provenientes del colon. Se considera que cuanto mayor es la expresión de $\alpha\beta 6$ en el tumor primario, mayor es la posibilidad de metástasis hepáticas. $\alpha\beta 6$ también induce la activación de MMP-3, mediante MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (Ramos et al, 2009). La integrina $\alpha\beta 6$ es capaz de regular a su vez la proliferación celular. La incubación de anticuerpos contra $\alpha\beta 6$ en las células de cáncer de colon HT29, provoca la activación de las caspasas 3 y 9, junto con la liberación de

citocromo C de la mitocondria al citosol (Zhao-yang et al, 2008). Así la pérdida de función de $\alpha\beta 6$ aumenta el porcentaje de células apoptóticas. Se conoce también que la subunidad $\beta 6$ se une, por su dominio citoplasmático a ERK, potenciando el crecimiento tumoral (Ahmed et al, 2002). La misma subunidad $\beta 6$ inhibe el fenotipo epitelial, induciendo la expresión de vimentina, proteína relacionada con la transición epitelio-mesénquima (EMT, *Epithelial-Mesenchymal Transition*), y la disminución de expresión de E-cadherina con la consecuente reducción de las uniones célula-célula (Ramos et al, 2009). Otro ejemplo de pérdida de adhesión relacionado con las integrinas lo ocasiona el complejo $\alpha 2\beta 1$ / pro-MMP-1/ colágeno tipo I detectado en queratinocitos. Este complejo produce proteólisis en puntos concretos de las uniones célula-matriz, como claro paradigma de la posibilidad de proteólisis dirigida (Dumin et al, 2001). Este hecho podría explicar la capacidad de migración de los queratinocitos. Koenig et al, demuestran otra implicación de integrinas $\beta 1$ en relación con adhesión, aunque en esta ocasión referido a E-cadherina. Observan una reducción del complejo E-cadherina/ β -catenina en su cultivo de células tumorales pancreáticas cuando éstas se cultivan en presencia de colágeno tipo I. Este hecho se relacionó con una mayor activación de FAK, que fosforilaba a E-cadherina interrumpiendo su unión a β -catenina, y con ello el complejo de adhesión. Como la integrina $\beta 1$ es capaz de activar FAK, comprobaron que si se impedía la interacción colágeno tipo I/ $\beta 1$, se prevenía la fosforilación de E-cadherina por parte de FAK. A su vez, detectaron una mayor actividad del *reporter* TOPflash como consecuencia de una mayor presencia de β -catenina en el núcleo tras la incubación de dichas células en presencia de colágeno tipo I (Koenig et al, 2006).

En células de colon de tejido normal, se expresan las integrinas $\alpha 2$, $\alpha 6$ y $\beta 1$. Si bien las integrinas $\alpha 2$ y $\beta 1$, presentan cierta variabilidad en cuanto a su expresión en adenomas y carcinomas, encontrándose una relación significativa entre la pérdida de $\alpha 2$ con tumores de estadios Dukes C y D (Koretz et al, 1991). También se ha detectado mayor expresión de $\alpha 5$ en líneas celulares de cáncer de colon con mayor capacidad tumorigénica, si bien esta característica parece venir dada en función de la molécula de la matriz extracelular con la que interacciona (Gong et al, 1997).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRAS TISULARES

La mayor parte de este trabajo se ha realizado empleando muestras tisulares de pacientes cedidas por el Banco de Tumores del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Dichas muestras fueron obtenidas, previo consentimiento informado, a partir de pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal (CCR) y sometidos a cirugía en el servicio de Cirugía II de dicho Hospital. La muestra poblacional se completó con otra serie de tumores donados por el Hospital Vall d'Hebrón de Barcelona, gracias al Dr. Ramón y Cajal. Se dispuso en total de 44 muestras tumorales de CCR primarios y de naturaleza esporádica. En el caso de las muestras procedentes del Hospital Clínico San Carlos, se obtuvo también la correspondiente muestra no tumoral, tomada al menos a una distancia de 10 cm de la zona considerada tumoral, además del historial clínico del paciente en cuestión. En el caso de las muestras cedidas por el Hospital Vall d'Hebrón, tan solo se contó con la disponibilidad de la muestra tumoral, sin posibilidad de acceder al historial clínico ni a su correspondiente muestra no tumoral.

Las muestras procedentes del Hospital Clínico San Carlos fueron analizadas por dos anatomopatólogos independientes. El criterio de selección seguido fue el de aceptar aquellas muestras que contasen con al menos un 80 % de tejido tumoral y menos de un 10% de tejido necrosado. Para dicho estudio, se emplearon cortes de 5 µm de grosor de los correspondientes tumores, teñidos con hematoxilina-eosina. Los cortes se realizaron con un criostato en el Servicio de Inmunología del propio Hospital.

La clasificación de los pacientes se realizó en función del estadio de Dukes, modificada por Gunderson & Sosin en 1978. Por otro lado, se incluyó la clasificación TNM (*Tumour, Node and Metastasis*) del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). El conjunto de las muestras se clasificó en función de la estabilidad (MSS/MSI-L) o inestabilidad (MSI-H) en microsatélites. Se recogieron, además, datos de presencia de metástasis, intervalo de supervivencia de los pacientes y recidiva tumoral.

2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN Y ADN

2.1 EXTRACCIÓN DE ARN

Las muestras tisulares estaban embebidas en *Tissue Teck*[®]. Sobre dichas preparaciones se realizaron cortes de 20 µm con el criostato y se almacenaron a -80°C hasta su posterior extracción.

El método empleado para la extracción fue un protocolo mejorado del método inicial desarrollado por Chomczynski y Sacchi en 1987. El agente usado para la extracción fue el *TRIzol*[®]. Se trata de un reactivo monofásico a base de fenol e isotiocianato de guanidina que mantiene la integridad del ARN mientras se rompen las células y se disuelven el resto de componentes celulares.

Se añadió 1 mL de *TRIzol*[®] a cada una de las muestras, homogeneizando bien la mezcla con una punta de pipeta primero y con una aguja después. Posteriormente se dejaron los tubos cinco minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se añadieron 200 µL de una mezcla de cloroformo:isoamílico (24:1) agitando vigorosamente. Tras tres minutos de reposo se centrifugaron las muestras en frío y a máxima velocidad durante quince minutos. Esto permitió separar la fase acuosa, en la que permanece el ARN, de la orgánica. Se reservó, por tanto, la fase acuosa y se añadieron 500 µL de isopropanol; se mezcló bien, y se dejó el ARN precipitando toda la noche a 4 °C. Los siguientes pasos consistieron en una centrifugación a 4 °C de treinta minutos a la máxima velocidad, que precipitó un *pellet* de ARN. Este *pellet* se lavó posteriormente dos veces con etanol al 75 %. Por último se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µL de agua libre de ARNasas.

La valoración espectrofotométrica del ARN se realizó en cubetas de cuarzo a 260 y 280 nm y las muestras se diluyeron 1:100 para su valoración (100 µL de volumen total). Se descartaron aquellas muestras en las que se detectó presencia de proteínas, según su ratio de las absorbancias 260/280 que debe estar entre 1,8 y 2. La integridad

del ARN se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % con TBE 1x (Tabla 1). El bromuro de etidio fue el agente empleado para visualizar las bandas de los ácidos nucleicos. Se cargó un volumen suficiente de ARN para 1 µg y se corrió el gel a 80 V durante unos cuarenta minutos. Se comprobó la integridad de las bandas 28S y 18S, así como la presencia o ausencia de ADN genómico. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Componente	Concentración final
Tris	0,89 M
Ácido bórico	0,88 M
EDTA	0,01 M

Tabla 1. Composición del tampón TBE 10x.

2.1.2 Purificación del ARN

Uno de los usos del ARN fue para estudios de expresión con matrices de oligonucleótidos. En esta técnica es imprescindible eliminar el ADN genómico y no se recomienda el uso de ADNasa. Por ello, en los casos en los que se detectó la presencia de ADN en la electroforesis, se empleó como método de purificación el *RNeasy[®] Micro kit* de Qiagen.

El ensayo se realizó a temperatura ambiente según el protocolo de la casa comercial. En primer lugar, se ajustó el volumen de la muestra a 0,1 mL con agua libre de nucleasas y se añadieron 0,35 mL de tampón RLT, proporcionado por el kit, mezclado, previamente, con β-mercaptoetanol, para inactivar las ARNasas, y 0,25 mL de etanol absoluto. De esta manera, se crearon las condiciones óptimas para que el ARN se uniera a la membrana de silica-gel de la columna, a la que seguidamente se transfirió la muestra. Se centrifugó a 10000 r.p.m. y se lavó la columna con 0,5 mL de tampón RPE, incluido en el kit. Se centrifugó en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Por último, se añadieron 0,5 mL de etanol al 80% y se centrifugó de nuevo. Para secar la membrana, se procedió a colocar la columna dentro

de un tubo nuevo y se centrifugó a la máxima velocidad. La elución del ARN se realizó con agua libre de nucleasas. El volumen eluido se ajustó en función de la cantidad de ARN de partida y se centrifugó a 13200 r.p.m. El ARN se recogió en un tubo de 1,5 ml en el que se introdujo la columna previamente.

Tras la purificación, se valoró el ARN obtenido, se comprobó su integridad y se almacenó a -80 °C.

2.2 EXTRACCIÓN DEL ADN

Para la extracción del ADN se emplearon modificaciones de dos procedimientos: Chomczynski & Sacchi y Blin & Stafford de 1976. En el caso del primer protocolo, se empleó la fase orgánica resultante de la extracción del ARN por el método del *TRIzol*[®]. A esa fase orgánica se le añadió 0,6 mL de etanol absoluto frío y se mezcló con el vórtex. A continuación la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 8.000 r.p.m con el objeto de precipitar el ADN. Por tanto, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con citrato sódico 0,1 M disuelto en etanol al 10 %. En un tercer lavado se empleó la solución B (NaCl 0,075 M y EDTA 0,02 M) para eliminar restos de citrato, y después se mantuvo dicho precipitado dos días a 55 °C en 0,3 mL de solución B con 10 µL de SDS al 10 % y 5 µL de proteinasa K concentrada a 20 mg/mL. Al final de la incubación, se añadieron 176 µL de NaCl 6 M. Se mezcló todo bien con el vórtex y se centrifugó durante 15 minutos a 13200 r.p.m. Se recogió el sobrenadante con contenía el ADN disuelto y se precipitó con isopropanol frío. A continuación se centrifugó media hora a temperatura ambiente y a 13200 r.p.m. El precipitado se lavó con etanol al 75 %. Una vez seco el ADN tras el lavado, se resuspendió con 20 µL de agua libre de nucleasas.

Para el procedimiento descrito por Blin & Stafford de 1976, posteriormente modificado, se partió de los bloques de tejidos preparados en Tissue-Tek[®]. Los bloques se cortaron con cuchillas estériles. Los fragmentos resultantes se introdujeron en un tubo de 10 mL con 2,5 mL de un tampón compuesto por Tris-HCl 0,01 M, EDTA 0,01 M y NaCl 0,15M. Todo ello se homogenizó con un politrón, cuyo vástago se había

mantenido la noche previa en EDTA 0,02 M. Para su uso entre las diferentes muestras, el vástago se aclaró con agua ultra pura estéril. A cada muestra homogeneizada, se le añadió 50 µL de proteinasa K 20 mg/mL y se homogeneizó de nuevo. El siguiente paso consistió en añadir 125 µL de SDS al 10 % seguido de una incubación de tres horas a 65 °C. Después se adicionó a la mezcla 2,5 mL de una solución con Tris-HCl 0,01 M, EDTA 0,01 M y NaCl 0,65 M a pH 7,5 y 5 mL de fenol. Todo ello se mezcló bien con el vórtex y se centrifugó 15 minutos a 4000 r.p.m para separar la fase acuosa, con el ADN disuelto, de la orgánica. Se recogió entonces la fase acuosa en un tubo nuevo de 10 mL y se le añadió 5 mL de una mezcla de cloroformo:isoamílico en proporción 24:1. Repetimos la mezcla con el vórtex y la centrifugación a 4000 r.p.m, pero ahora solo durante 5 minutos. Se recogió la fase acuosa en un tubo de 50 mL que contenía entre 10-13 mL de etanol absoluto frío. El ADN se dejó precipitar toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se centrifugaron los tubos a 4 °C durante 15 minutos, desechándose el sobrenadante. El precipitado se lavó con 2 mL de etanol frío al 70 %. Por último, el precipitado se secó y se resuspendió en 0,3 mL de agua libre de nucleasas.

Su valoración espectrofotométrica se realizó en cubetas de cuarzo de un volumen de hasta 100 µL. El ADN se diluyó 1:100 y se valoró a 260 nm para conocer su concentración. También se valoró a 280 nm. El ratio 260/280 entre 1,8 y 2 da idea de la pureza del ADN, libre de posibles contaminaciones proteicas que podrían haberse ido arrastrando en el proceso de extracción. Por otro lado, y con el mismo objetivo, se desarrolló un gel de agarosa al 1% para comprobar la integridad del ADN y que no apareciesen bandas altas, de mayor peso molecular, motivo de la asociación del ADN con proteínas.

3. ESTUDIO DE INESTABILIDAD EN SECUENCIAS MICROSATÉLITES

Con el fin de definir las características de la población y clasificar las muestras como fenotipo mutador positivas o negativas, MSI-H (*MicroSatellite Instability-High*) o MSI-L/MSS (MSI-L, *MicroSatellite Instability-Low* y MSS, *MicroSatellite Stable*), se procedió al estudio de cinco repeticiones mononucleotídicas (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y MONO-27) y dos repeticiones pentanucleotídicas (Penta C y Penta D). Las

repeticiones pentanucleotídicas fueron empleadas sobre todo con el fin de discernir posibles mezclas o contaminaciones de las muestras dada su alta tasa de polimorfismos y una baja tendencia a presentar inestabilidad. Por el contrario, los marcadores mononucleotídicos son prácticamente en su totalidad, monomórficos. El sistema empleado fue el *MSI Análisis System, Version 1.2* de *Promega*.

Los microsatélites analizados aparecen en la siguiente Tabla (Tabla 2). Se consideró como consenso para definir un tumor como MSI-H si dos o más de estos marcadores presentan inestabilidad. La muestra se clasificó como MSI-L/MSS si presentaba uno o ninguno de los marcadores alterados.

Microsatélite	Número del GenBank®	Secuencia mayoritaria	Tamaño del fragmento amplificado
BAT 25	L04143	(A) ₂₅	114-124
BAT 26	U41210	(A) ₂₆	103-115
NR-21	XM_033393	(A) ₂₁	94-101
NR-24	X60152	(A) ₂₄	130-133
MONO-27	AC007684	(A) ₂₇	142-154
Penta C	AL138752	(AAAAG) ₃₋₁₅	143-194
Penta D	AC000014	(AAAAG) ₂₋₁₇	135-201

Tabla 2. Microsatélites analizados según *MSI Análisis System, Version 1.2* de *Promega*.

El protocolo que recomienda la casa comercial parte de 1-2 ng de ADN molde, que junto a 1 µL de oligonucleótidos para el análisis de MSI, la *AmpliTaq Gold* polimerasa y el correspondiente tampón 10x en un volumen final de 10 µL, se someten al programa detallado en la Figura 1.

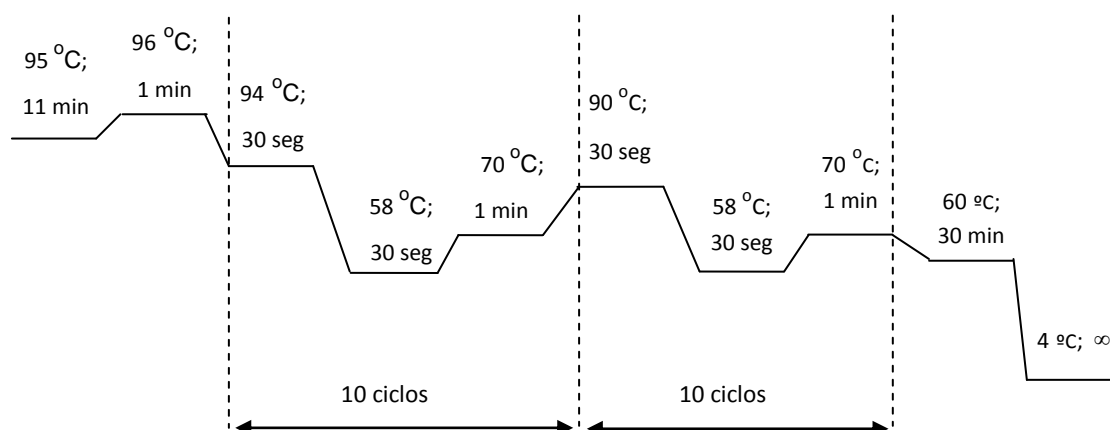


Figura 1. Esquema de la reacción de PCR para análisis de inestabilidad en secuencias microsatélite.

A continuación se preparan las muestras con una dilución del *Internal Lane Standard 600*, proporcionado en el *kit*, en 24 µL de formamida desionizada por el número de muestras a analizar. Se prepara 1 µL de cada muestra amplificada en la mezcla de formamida y se desnaturaliza durante 3 minutos a 95 °C. El análisis de los fragmentos se realiza con el *ABI Prism 310 Genetic Analyzer*, por medio del programa informático de análisis *GeneScan*, ambos de *PE Applied Biosystems*. Las Figura 2 y 2 bis muestran un par de ejemplos de muestras analizadas por este programa.

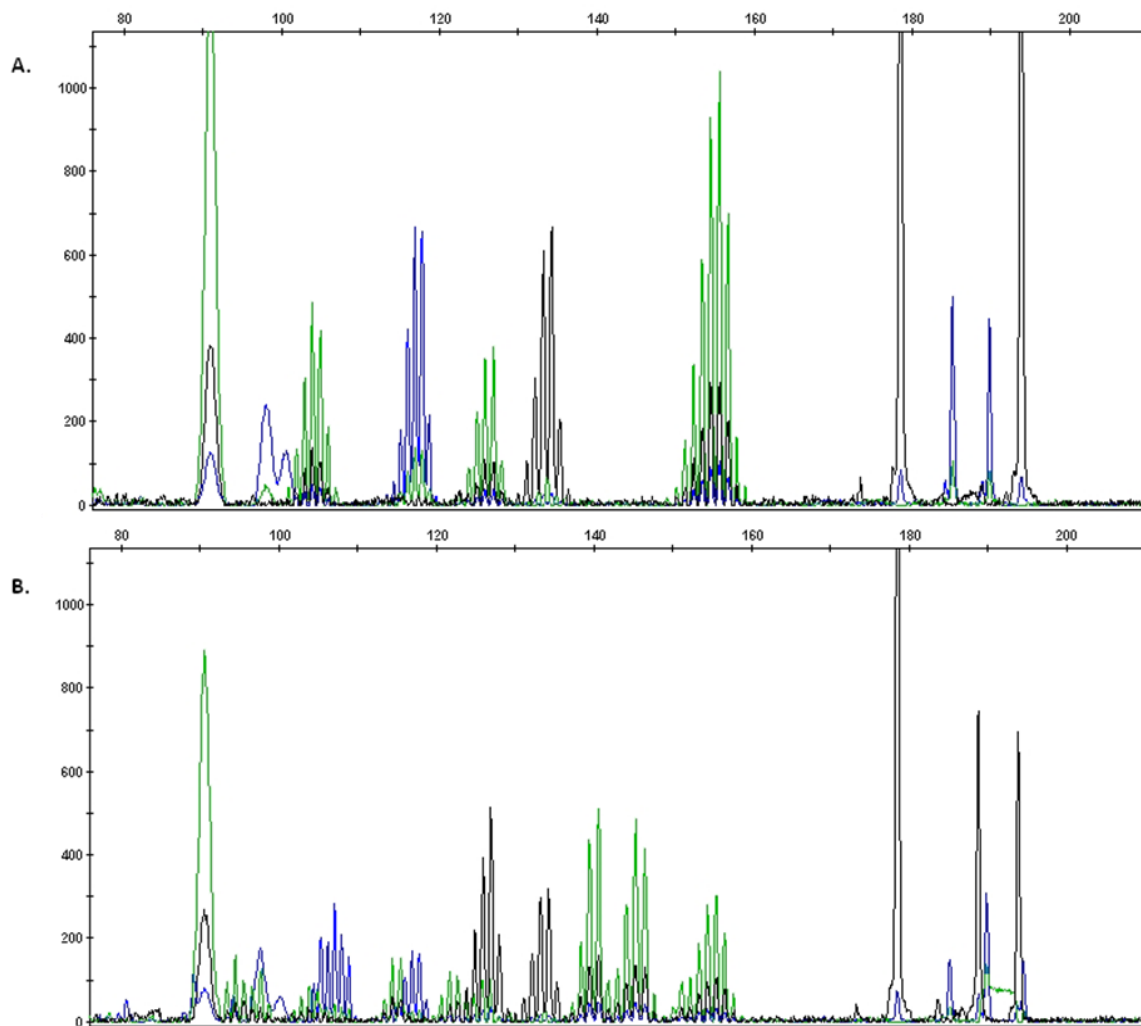


Figura 2. Ejemplos de resultados tras el análisis de microsatélites con el programa *GeneScan*. El marcador NR-21 aparece a la altura de 100 pb en color verde, BAT-26 a 110 pb en color azul, BAT-25 está en las 120 pb y en color verde, NR-24 se ve sobre las 130 pb en color negro y Mono-27 está a la altura de 150 pb y en color verde. Los marcadores pentanucleotídicos Penta C y Penta D aparecen en color negro a 164, 174 pb y en azul a 168, 187 pb respectivamente. Las imágenes A y B corresponden a una muestra normal y tumoral, respectivamente, que tras su análisis fue clasificada como inestable para los microsatélites estudiados.

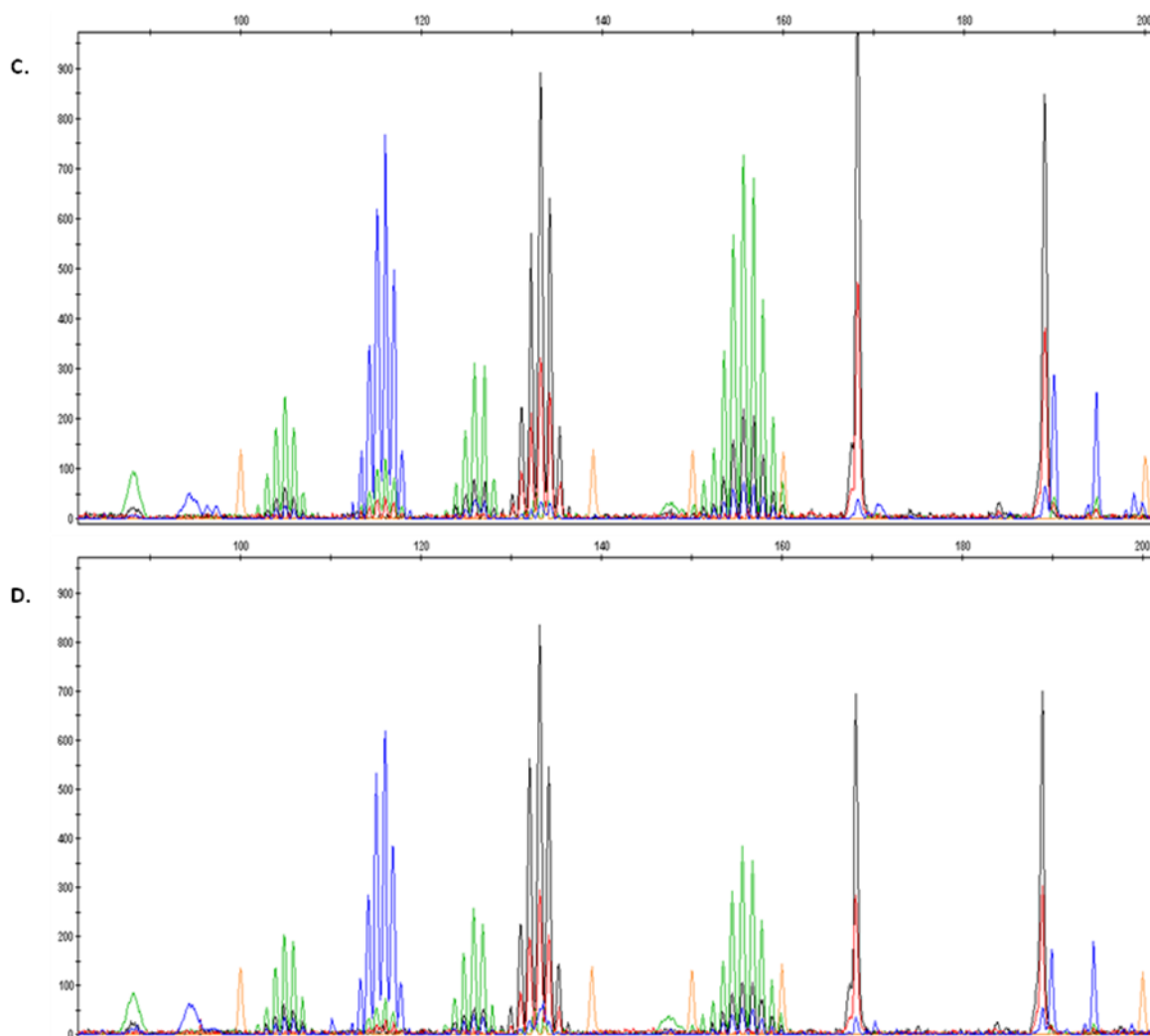


Figura 2 bis. Ejemplos de resultados tras el análisis de microsatélites con el programa *GeneScan*. El marcador NR-21 aparece a la altura de 100 pb en color verde, BAT-26 a 110 pb en color azul, BAT-25 está en las 120 pb y en color verde, NR-24 se ve sobre las 130 pb en color negro y Mono-27 está a la altura de 150 pb y en color verde. Los marcadores pentanucleotídicos Penta C y Penta D aparecen en color negro a 164, 174 pb y en azul a 168, 187 pb respectivamente. Las imágenes C y D pertenecen a una muestra normal y tumoral, respectivamente, de un tumor clasificado como estable para microsatélites.

4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MATRICES DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Estos estudios fueron llevados a cabo sobre unas membranas de oligonucleótidos de la casa Superarray cuyos nombres comerciales son *Oligo GEArray*[®]

Human Wnt Signalling Pathway Microarray: OHS-043 y *Oligo GEArray® Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules Microarray: OHS-013*. Estas matrices contienen 114 genes, cada una, relacionados con la vía proliferativa Wnt y genes de adhesión celular y metaloproteasas respectivamente.

Los genes estudiados en la membrana de oligonucleótidos *OHS-043* son los siguientes (agrupados por familias y funciones):

Vía señalización Frizzled-1:

AXIN1, AXIN2, DIXDC1, DVL1, DVL2, DVL3, FZD10, FZD3, FZD4, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9.

Vía señalización Frizzled-2:

WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16.

Regulación de la vía de señalización en los receptores WNT:

Reguladores negativos de receptores WNT:

CXXC4, DKK1, DKK2, DKK3, DKK4, FRZB (FRP-3), FSHB, NLK.

Antagonistas de unión a Wnt:

SFRP1, SFRP4 (FRP-4), SFRP5.

Otros reguladores de la vía: PPP2CA, PPP2CB, PPP2R1A, PPP2R1B, SENP2, TCF7L1.

Regulación de crecimiento y proliferación:

Regulación de crecimiento: PPP2CA, PPP2CB, PPP2R1A, PPP2R1B, WISP1, WISP2.

Regulación de proliferación celular: CTBP1, CTBP2, LRP5.

Otros genes relacionados con crecimiento y proliferación celular: FRAT1, FRAT2.

Regulación del ciclo celular:

APC, APC2, CCND1, CCND2, CCND3, FGF4, PPP2CA, PPP2CB, PPP2R1A, PPP2R1B.

Regulación de la transcripción:

Factores transcripcionales: EP300, FOSL1 (Fra-1), FOXN1, JUN, MYC, PITX2, T (Brachyury), TCF7L1.

Otros reguladores de la transcripción: AES (TLE / Groucho), CTNNB1 (catenin), CTNNBIP1 (ICAT), LEF1, NLK, PPP2CA, PPP2CB, PPP2R1A, PPP2R1B, PYGO1, PYGO2, SOX17, TCF7 (Tcf-1), TCF7L2, TLE1, TLE2, TLE3, TLE4, WNT1.

Modificaciones de la actividad proteica:

Actividad proteína quinasas: CSNK1A1, CSNK1A1L, CSNK1D, CSNK1G1, CSNK1G2, CSNK1G3, CSNK2A1, CSNK2A2, CSNK2B, CTBP1, GSK3A (GSKalpha), GSK3B (GSKbeta), MARK4, NLK, WIF1.

Complejo proteína fosfatasa 2: PPP2CA, PPP2CB, PPP2R1A, PPP2R1B.

Ubiquitinación proteica: BTRC (b-TrCP), FBXW11, FBXW2, SHFM3.

Otros genes relacionados con la señalización WNT:

BCL9, DAAM1, DAAM2, FZD1, FZD2, FZD5, KREMEN1, KREMEN2, LRP6, NKD1, NKD2, PORCN, RHOA, SLC9A3R1.

Los genes estudiados en la membrana de oligonucleótidos *OHS-013* son los siguientes (agrupados por familias y funciones):

Moléculas de adhesión celular:

Moléculas transmembrana: CD44, CDH1 (E-cadherina), HAS1, ICAM1, ITGA1 (integrina $\alpha 1$), ITGA2 (integrina $\alpha 2$ / LFA1 α), ITGA2B (integrin $\alpha 2\beta$), ITGA3 (integrina $\alpha 3$), ITGA4 (integrina $\alpha 4$ / LFA-4), ITGA5 (integrina $\alpha 5$), ITGA6 (integrina $\alpha 6$), ITGA7 (integrina $\alpha 7$), ITGA8 (integrina $\alpha 8$), ITGA9 (integrina $\alpha 9$), ITGA10 (integrina $\alpha 10$), ITGA11 (integrina $\alpha 11$), ITGAL (integrina αL / LFA1a / CD11a), ITGAM (integrina αM), ITGAV (integrina αV), ITGAX (integrina αX), ITGB1 (integrina $\beta 1$), ITGB2 (integrina $\beta 2$), ITGB3 (integrina $\beta 3$ / CD61), ITGB4 (integrina $\beta 4$), ITGB5 (integrina $\beta 5$), ITGB6 (integrina $\beta 6$), ITGB7 (integrina $\beta 7$), ITGB8 (integrina $\beta 8$), MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, NCAM1, PECAM1, SELE (ELAM-1 / E-selectina), SELP (L-selectina), SELP (P-selectina), SGCE, SPG7, VCAM1.

Adhesión célula-célula: CD44, CDH1 (E-cadherina), COL11A1, COL14A1, COL19A1, COL6A2, COL8A2, CTNND1 (catenina d1), ICAM1, ITGA8, VCAM1.

Adhesión célula-matriz: ADAMTS13, CD44, ITGA1 (integrina $\alpha 1$), ITGA2 (integrina $\alpha 2$ / LFA1 α), ITGA2B (integrina $\alpha 2\beta$), ITGA3 (integrina $\alpha 3$), ITGA4 (integrina $\alpha 4$ / LFA-4), ITGA5 (integrina $\alpha 5$), ITGA6 (integrina $\alpha 6$), ITGA7 (integrina $\alpha 7$), ITGA8 (integrina $\alpha 8$), ITGA9 (integrina $\alpha 9$), ITGA10 (integrina $\alpha 10$), ITGA11 (integrina $\alpha 11$), ITGAL (integrina αL / LFA1a / CD11a), ITGAM (integrina αM), ITGAV (integrina αV), ITGAX (integrina αX), ITGB1 (integrina $\beta 1$), ITGB2 (integrina $\beta 2$), ITGB3 (integrina $\beta 3$

/ CD61), ITGB4 (integrina β 4), ITGB5 (integrina β 5), ITGB6 (integrina β 6), ITGB7 (integrina β 7), ITGB8 (integrina β 8), SGCE, SPP1 (OPN /osteopontina), THBS3 (TSP-1).

Otras moléculas de adhesión: CNTN1, COL11A2, COL12A1, COL15A1, COL16A1, COL18A1 (LOC51695 / endostatina), COL24A1, COL27A1, COL4A3, COL4A6, COL5A1, COL5A3, COL6A1, COL6A3, COL7A1, COL8A1, COL9A1, CSPG2, CTGF, CTNNA1 (catenina a), CTNNB1 (β -catenina), CTNND2 (catenina d2), FN1 (fibronectina-1), KAL1, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMA4, LAMA5, LAMB1 (laminina B1), LAMB2 (laminina B2), LAMB3 (laminina B3), LAMC1, SPOCK, THBS1 (TSP1), THBS2 (TSP2), THBS4 (TSP4), TNA, TNC, VTN (vitronectina).

Proteínas de matriz extracelular:

Constituyentes básicos de membrana: COL4A2, COL4A3, COL4A6, COL7A1, COL8A2, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMA4, LAMA5, LAMB1, LAMB2, LAMB3, LAMC1, SPARC.

Colágenos y constituyentes estructurales de membrana de matriz extracelular: COL11A1, COL11A2, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL18A1 (LOC51695/endostatina), COL19A1, COL1A1, COL24A1, COL27A1, COL4A2, COL4A3, COL4A6, COL5A1, COL5A3, COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL7A1, COL8A1, COL8A2, COL9A1, FN1, KAL1, LAMA4.

Proteasas de matriz extracelular: ADAMTS1 (Meth 1), ADAMTS8 (Meth 2), ADAMTS13, MMP-1 (colagenasa-1), MMP-2 (gelatinasa A), MMP-3 (estromelisina-1), MMP-7 (matrilisina), MMP-8 (colagenasa de neutrófilos), MMP--9 (gelatinasa B), MMP10 (estromelisina-2), MMP-11 (estromelisina-3), MMP-12 (elastasa de macrófagos), MMP-13 (colagenasa-3), MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-20 (enamelisina), MMP-24, MMP-26, SPG7, TIMP1.

Inhibidores de proteasa de matriz extracelular: COL4A3, COL6A3, COL7A1, KAL1, SPOCK, THBS1, TIMP1, TIMP2, TIMP3.

Otras moléculas de matriz extracelular: CSPG2, CTGF, ECM1, HAS1, LAMB4, SPP1 (OPN/osteopontina), TGFBI, THBS2, THBS3, THBS4, TNA, TNC, VTN.

4.1 CALIDAD DEL ARN Y SÍNTESIS DEL ADNc

El ARN que se emplea en esta técnica tiene que ser de una buena calidad. Así, es imprescindible que la relación entre las medidas de absorbancia a 260 y 280 nm sea igual a 2 y que la concentración supere los 11 ng/ μ L. También es necesario que las bandas correspondientes al ARN ribosómico 28S y 18S sean nítidas en un gel de agarosa, indicio de su no degradación.

Para la síntesis de ADNc a partir de ARN se necesita una reacción de retrotranscripción. En esta primera fase del protocolo se empleó el *True Labeling-AmpTM 2.0 kit*. Se partió de 3 μ g de ARN a los que se añadió 1 μ L del componente G1 del kit, completando con agua hasta un volumen final de 10 μ L. Esta primera mezcla se incubó en el termociclador durante 10 minutos a 70°C. En este paso se desnaturalizan los componentes a fin de evitar estructuras secundarias.

A continuación se preparó la mezcla de reacción para la síntesis de ADNc, que constituye la propia reacción de retrotranscripción. Por tanto en este paso se sintetiza el ADNc a partir del ARN. La mezcla de reacción fue la siguiente (Tabla 3):

Componente	Volumen (μ L) por reacción
Agua libre de ARNasa	4
Tampón para síntesis de ADNc 5x (G3)	4
Inhibidor de ARNasa	1
Enzima para la síntesis de ADNc	1
Volumen final	10

Tabla 3. Composición de la mezcla para la reacción de retrotranscripción.

Esta mezcla de reacción se añadió al volumen previo del primer paso. Tras mezclar bien los volúmenes, se incubó en el termociclador con el siguiente programa de reacción (Figura 3):

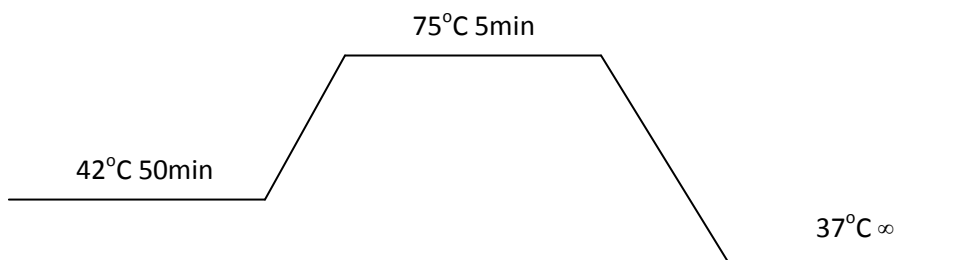


Figura 3. Esquema de reacción de retrotranscripción. Tras el paso previo de desnaturalización de los componentes, se incubó la mezcla de reacción con la enzima retrotranscriptasa a fin de obtener ADNc.

4.2 SÍNTESIS, MARCAJE Y AMPLIFICACIÓN DE ARNc

En este siguiente paso del procedimiento, el ADNc sintetizado pasa a ARNc marcado con biotina-16-UTP (Roche). La mezcla de reacción que se empleó fue (Tabla 4):

Componente	Volumen (μL) por reacción
Tampón ARN polimerasa 2,5x (G24)	16
Biotina-UTP 10 mM	2
Enzima ARN polimerasa (G25)	2
Volumen final	20

Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción para síntesis, marcaje y amplificación de ADNc.

Esta mezcla de reacción se añadió a los 20 μL previos, se mezcló y se incubó a 37 °C durante toda la noche, para conseguir el mayor rendimiento posible de ARNc.

4.3 PURIFICACIÓN DE ARNc

Tras el proceso previo de síntesis de ARNc, es necesario purificar la mezcla de restos de otros reactivos que puedan interferir en la hibridación. En este caso se emplea el *ArrayGrade™ cRNA Cleanup Kit* para la purificación.

El volumen final de ARNc se completa hasta 100 µL con agua libre de ARNasas y, en un tubo nuevo, se añaden 315 µL de *Lysis & Binding Buffer* (G6), mezclando bien, y otros 315 µL de etanol 100 %. Todo ello se pasa por la columna que proporciona el kit, se centrifuga durante treinta segundos a 10000 r.p.m. Así el ARNc queda unido a la columna y se puede descartar el volumen eluido. A continuación se lava la columna con 600 µL de *Washing Buffer* (G17 reconstituido con etanol). El lavado se hace con una centrifugación de treinta segundos a 13200 r.p.m. Una vez eliminado el tampón de lavado, se repite la centrifugación para eliminar restos. Se hace un segundo lavado con otros 200 µL del componente G17, repitiendo el mismo procedimiento de centrifugación. Para la elución se emplearon 50 µL del tampón Tris 10mM pH 8.0 libre de ARNasas (G26). Se dejó incubar dos minutos para que el volumen impregnase toda la columna y, por último, se centrifugó a 10000 r.p.m. durante un minuto. El ARNc eluido puede ya valorarse a 260 y 280 nm para conocer el rendimiento final del proceso y la calidad del producto final.

4.4 HIBRIDACIÓN

El ARNc obtenido en los pasos anteriores se hibridó sobre las membranas de oligonucleótidos. Estas membranas presentan la ventaja, sobre versiones anteriores de ADNc, de ser más específicas.

Las membranas deben ser activadas humedeciéndolas con 5 mL de agua durante cinco minutos. Previamente, se pone el horno de hibridación a 60 °C y la solución de prehibridación *GEAhyb Hybridation Solution* se calienta también a la misma temperatura. Con 2 mL de dicha solución se incuba la membrana a 60 °C en su correspondiente cilindro dentro del horno de hibridación durante, al menos, dos horas

a una velocidad de 5-10 r.p.m. Con este paso previo se busca “tapizar” la membrana para evitar uniones inespecíficas.

Tras la prehibridación, se diluyeron al menos 2 µg de ARNc en 750 µL de la solución de prehibridación y se dejó hibridando durante toda la noche a 60 °C con una velocidad de 5-10 r.p.m.

4.5 LAVADOS

Después de la hidridación, se retira la solución de prehibridación con el ARNc marcado y se procede a los lavados de la membrana. La solución con el ARNc puede guardarse en el congelador a -20 °C, en caso de que hayan existido problemas con la hibridación y se requiera su repetición.

Se dispone de dos soluciones de lavado que previamente deben calentarse a 60 °C. La solución de lavado 1 se prepara con SSC 20x y SDS al 1 %. El lavado con 5 mL de esta mezcla se prolonga durante 15 minutos a una temperatura de 60 °C. La solución de lavado 2, se compone de SSC 20x y SDS al 0,5 %. Con otros 5 mL de la segunda solución, se hace el siguiente lavado manteniendo la misma temperatura y tiempo que en el caso anterior.

4.6 DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

El siguiente paso, ya a temperatura ambiente, consiste en bloquear la membrana con 2 mL de *GEAblocking Solution Q* durante cuarenta minutos a una velocidad de 20-30 r.p.m. A continuación, se incuba la membrana con AP-SA (*Alkaline phosphatase-conjugated streptavidin*) diluido 1:8000 en el tampón F1x, proporcionado en el kit en una concentración de 5x. AP-SA es la fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina. La estreptavidina tiene elevada afinidad por la biotina, que es el marcador que se empleó para marcar el ARNc. De este modo la estreptavidina se une a la biotina, quedando libre la fosfatasa alcalina para actuar sobre el sustrato

luminiscente, que se añadirá en el último paso para poder detectar así en ARNc hibridado a la membrana.

Después de la unión entre estreptavidina y biotina (del ARNc), se lava la membrana cuatro veces con tampón F1x, con una duración de cinco minutos cada lavado. Posteriormente se aclara la membrana con 3 mL del tampón G, invirtiendo tres veces el cilindro que contiene la membrana. El último paso consiste en incubar durante 2-5 minutos, 1 mL del sustrato *CDP-Star*, sustrato quimioluminiscente, sobre el que actúa la fosfatasa alcalina, que dará lugar a luz detectable por el film fotográfico empleado para la detección de la señal. Las películas utilizadas fueron *HyperfilmTM* de *Amersham Bioscience*, variando el tiempo de exposición según la intensidad de la señal. Los *films* procedentes del revelado de las membranas, fueron escaneados con el programa informático *Quantity One[®]* (*Bio Rad*), y guardados en formato *Tiff*, con 16 bits por canal.

Para el análisis de los resultados de estos experimentos, se contó con el software informático *GEArray Expression Analysis Suite* de *Superarray*. Se trata de un programa informático *online* que permitió, una vez cargadas las imágenes escaneadas de las correspondientes membranas, transformar la intensidad de señal en valores numéricos que fueron normalizados con el gen endógeno más conveniente. La posibilidad de analizar dichos datos agrupados según el criterio de estabilidad en microsatélites, permitió comparar grupos de muestras entre sí y generar una lista de genes con diferente grado de hibridación sobre la membrana y, por ende, diferente cantidad de ARNm.

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez seleccionados los posibles candidatos con diferencias de $\pm 2,5$ veces de expresión génica entre ambos grupos, se procedió a hacer un sencillo análisis estadístico para comprobar su significatividad. Previo a ello, se caracterizó si los valores de la variable correspondiente seguían una distribución normal mediante la prueba de *Shapiro-Wilk*, en cuyo caso se empleó la prueba de *t-Student* para verificar

una diferencia de medias significativa, o una distribución no normal. En este último caso se recurrió a la prueba no paramétrica, *U de Mann-Withney*.

5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

El estudio de expresión génica con las membranas de oligonucleótidos proporcionó datos preliminares en cuanto a los niveles de ARN mensajero diferenciales entre los grupos considerados. La PCR cuantitativa a tiempo real es una técnica mucho más sensible que permite conocer de forma cuantitativa el número de copias de un determinado gen, siempre normalizado respecto a un gen endógeno de expresión constitutiva.

Brevemente, la técnica emplea una serie de *primers* o cebadores específicos para el gen objeto de estudio, así como una sonda *TaqMan MGB probe*, también específica. La particularidad de esta sonda consiste en que posee en el extremo 5' un agente fluoróforo (6-FAM). En el extremo 3' consta de un agente amortiguador no fluoróforo, NFQ (*NonFluorescent Quencher*). La sonda cuenta además con el *MGB* (*Minor Groove binder*) que permite aumentar la T_m de la sonda sin incrementar su longitud. La técnica aprovecha la capacidad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa. De este modo, mientras la sonda está íntegra, el extremo 3' amortigua la fluorescencia del fluoróforo. Sin embargo, la ADN polimerasa en su avance, al ir sintetizando la hebra complementaria, rompe la sonda, liberando el extremo 5' con el fluoróforo que deja de estar bajo la influencia del amortiguador o *quencher*, emitiendo fluorescencia (Figura 4).

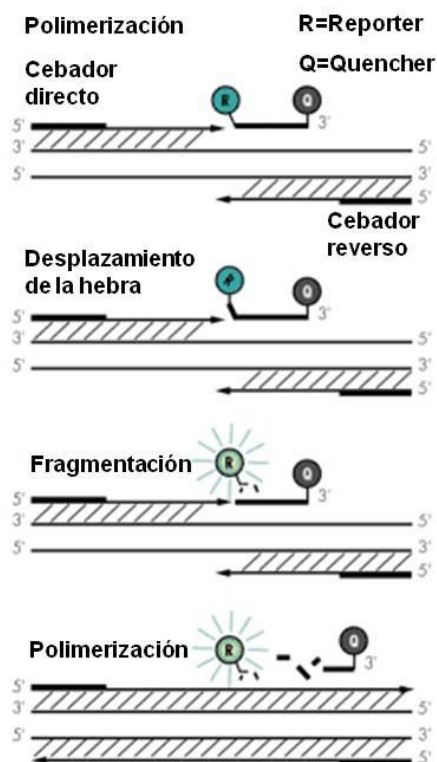


Figura 4. Explicación de la generación de fluorescencia en la reacción PCR cuantitativa a tiempo real por el avance de la enzima polimerasa sobre la sonda marcada con un fluoróforo.

Las sondas pueden ser de diferentes tipos, según su capacidad de unión a su secuencia específica. En nuestro caso se emplearon las sondas “m”, que se caracterizan por unirse a uniones exón-exón, permitiendo así discriminar frente a posibles contaminaciones con ADN genómico. Como medio de reacción se empleó *TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)* (que incluye *AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase*).

En cuanto al resto de la técnica, simplemente consiste en la síntesis exponencial de copias de unos 100-600 pares de bases a partir de una molécula mayor de ADN de doble cadena (en este caso ADNc sintetizado a partir del ARN en la reacción de retrotranscripción). Es importante saber que la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real se analiza en la zona en la que la reacción se hace lineal. Así, el programa informático que analiza la emisión de fluorescencia de cada muestra, coloca el nivel de

detección o umbral en dicha zona, que suele coincidir con la parte baja de la curva en las representaciones exponenciales. El punto de corte del umbral con la curva, se conoce como Ct y hace referencia al ciclo de amplificación de la muestra (Figura 5).

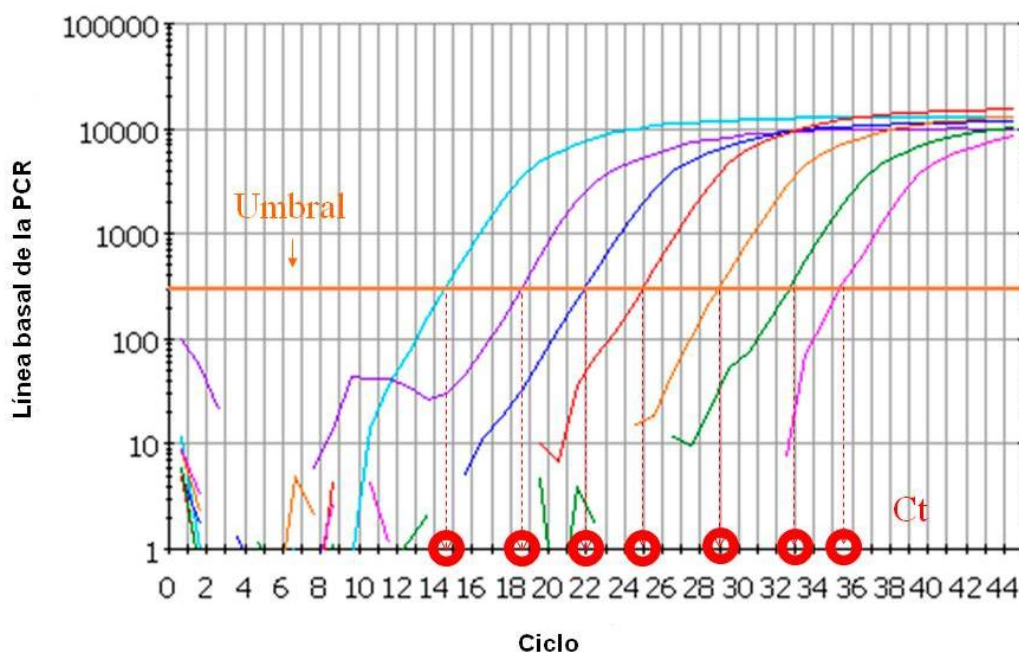


Figura 5. Representación de curvas logarítmicas por detección de fluorescencia en la PCR cuantitativa a tiempo real.

5.1 SÍNTESIS DEL ADNc

Mediante una reacción de retrotranscripción se transformó el ARN a ADNc. En general, se partió de 2 μg de ARN que se diluyeron en 50 μL de agua. A esta dilución de ARN se le añadió la mezcla de reacción, que queda recogida en la siguiente Tabla (Tabla 5).

Componente	Volumen (μ L)
Tampón de transcripción inversa 10x	10
dNTP 25x	4
<i>Random Primers</i> 10x	10
<i>Multiscribe reverse transcriptase</i> 50U/ μ l	5
Inhibidor ARNsa	5
Agua libre de nucleasas	16
Volumen total	50

Tabla 5. Componentes de la reacción de retrotranscripción.

El programa para la retrotranscripción utilizado fue el detallado en la Figura 6:



Figura 6. Esquema de reacción RT-PCR. El ARN de partida junto con la enzima retrotranscriptasa es sometido a este programa con objetivo de sintetizar ADNc.

Posteriormente a esta reacción de retrotranscripción, se procedió a la realización de una PCR para comprobar que la síntesis de ADNc había transcurrido sin problemas (Tabla 6). Para ello se dispuso de unos cebadores para *GAPDH*, siendo capaces de hibridar en uniones exón-exón en su hebra molde.

Componente	Volumen (μL)
Agua libre de nucleasas	38,75
Tampón 10x	5
MgCl ₂ 25mM	2
dNTP (10mM cada uno)	1
<i>Primer forward</i> (10μM)	1
<i>Primer reverse</i> (10μM)	1
Taq Polimerasa (5U/μL)	0,25
ADNc	1

Tabla 6. Mezcla de reacción para la PCR de *GAPDH*. Esta PCR fue ejecutada a modo de comprobación de que el proceso de retrotranscripción de ADNc había transcurrido de forma adecuada.

5.2 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Para este ensayo se diluyó el ADNc sintetizado en agua y se añadieron los cebadores y sonda específicos, así como el *TaqMan Universal PCR Master Mix 2x* de la casa comercial Applied Biosystems. El protocolo seguido fue el siguiente (Tabla 7):

Componente	Volumen por reacción (μL)
TaqMan Gene Expression Assay	1
ADNc + agua	9
TaqMan Universal PCR Master Mix	10
Volumen total	20

Tabla 7. Guía de la mezcla de reacción para la PCR cuantitativa a tiempo real. El componente *TaqMan Gene Expresión Assay* contiene la sonda marcada con el fluoróforo y los oligonucleótidos específicos del gen objeto de estudio. La mezcla *TaqMan Universal PCR Master Mix* incluye, a su vez, la enzima y el resto de componentes requeridos para su actividad.

Los datos de luminiscencia que cada muestra proporcionó para cada gen, se designan como Ct. En nuestros ensayos, cada pocillo se realizó por duplicado, por lo que se calculó la media del Ct, y a éste se le restó el Ct de *GAPDH*, gen que en nuestro caso consideramos como endógeno. De esta forma se obtiene el dato del ΔCt . A su vez, a este valor, se le resta el ΔCt de la muestra que vaya a tomarse como referencia de expresión normal, que para nosotros fue una mezcla de muestras no tumorales. El apunte final se conoce como $\Delta\Delta\text{Ct}$ y a su valor negativo en potencia de base 2, RQ. El dato de RQ se calcula debido a que supone una ayuda visual a la hora de entender el resultado, pero no constituye una escala lineal. La interpretación del valor RQ es la siguiente:

- $\text{RQ} < 0,5$ Se considera que existe menos del 50 % de número de copias que la muestra considerada como referencia normal de expresión.
- $\text{RQ} = [0,5 - 2]$ Se considera como nivel de expresión normal al estar comprendido entre $\pm 50\%$ de lo considerado como normal, valor representado por la unidad.
- $\text{RQ} > 2$ Indica niveles superiores al 50 % de la expresión designada como normal.

Todos los ensayos fueron realizados al menos por duplicado.

5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.3.1 Análisis estadístico para los valores de expresión de genes de la vía WNT y relacionados con MMPs/adhesión por PCR cuantitativa respecto a la agrupación de tumores con y sin inestabilidad en microsatélites

Los valores de RQ al no cumplir una escala lineal no son aptos para su uso en cálculos estadísticos. Por ello se recurrió a los valores de $\Delta\Delta\text{Ct}$, o ΔCt en su defecto, en casos en los que el gen objeto de estudio no mostró niveles detectables de fluorescencia en el *pool* de ocho muestras no tumorales.

El primer paso fue comprobar la normalidad o no de los datos gracias a la prueba de *Shapiro-Wilk*. Tras comprobar que los grupos tumorales considerados (alta y baja inestabilidad de microsatélites) se adaptaban a uno u otro tipo de distribución, se adoptaron las herramientas estadísticas adecuadas. Así, si la población seguía una distribución normal, se recurrió a la *t-Student* para concluir la diferencia significativa o no de la media de ambas muestras poblacionales. Se tuvo además en cuenta que aquella diferencia fuese de, al menos, un ciclo y que los intervalos de confianza para el 95 % no resultasen solapados, lo que garantizaba aun más la diferencia entre ambos grupos. Si la distribución resultaba ser no normal, las pruebas no paramétricas fueron las de elección. La U de *Mann-Withney* permitió afirmar si las diferencias de las medias eran significativas o no en dichos casos.

5.3.2 Análisis estadístico para los valores de expresión de genes de la vía WNT y relacionados con MMPs/adhesión por PCR cuantitativa respecto a los datos clínicos.

En primer lugar hay que reseñar que solo se contó con los datos clínicos de la subpoblación de tumores MSI-L/MSS. Considerando esta condición, se estudiaron las diferencias de los genes que mostraron diferencias significativas entre los tumores MSI-H y MSI-L/MSS frente a parámetros clínicos como: estadio Dukes, localización del tumor, número de ganglios afectados y el tamaño. Previamente se estudió la normalidad o no del conjunto de datos (*Shapiro-Wilk*). Si la población era normal, se continuó con un estudio de igualdad de medias gracias al ANOVA, previa comprobación de homocedasticidad, y de diferencia de medias entre subdivisiones individuales gracias a la *t-Student*. Si los datos se amoldaban a una distribución no normal, el estadístico empleado fue la prueba de *Kruskal-Wallis*.

6. SECUENCIACIÓN DE LAS SECUENCIAS MICROSATÉLITE DEL PROMOTOR DE MMP-7

Para el estudio de las secuencias microsatélite del promotor de *MMP-7*, se emplearon los cebadores descritos por Jormsjö et al, 2001. En la Figura 7 aparece la

zona del promotor analizada, con dos secuencias microsatélite mononucleotídicas, A₇ y A₉.

```

GGACACAGCACAGTTGTATATAGAGTGGCCACTAATCCAGCCACACAGCAGCATTTCATCTG
CCTCCTGCCATCTTTCCCCTGTATGGAGAACCACAGGATTTTGGTGATGTTCTATTTCTTGACTT
TGGTGACGGTTACAGTATTTGCTTAATTATTATTTTACATGTTTTGTGCACTTTTCCAA
ACCTTTTAATTGTTAAGAATATATGGTACCATGTATTTAAGAATACATGGTACCATATAATAAG
AATATATATTTAAGAATATATATTATTCTTTAAGAATATA TGGTACCATAATGTCCTGAATGATA
CCTATGAGAGCAGTCATTTGACTTTGGCAAAAAATGAGGTTTCTCATGGAGTCAATTTATGC
AGCAGACAGAAAAAAATCCTTTGAAAGACAAATACATTGTGTGCTTCCTGCCAATAACGAT
GTAATACTTCCTCGTTTTAGTTAATGAAAAATAACACATACTTTCAAAGTTCTGTAGACTCTAAA
AAGAAAGAAAACACTCAAATGAGTCACCTATTTCCACATT CGAGGCTGAGAAGCTATATAAAT
TTCTGCAGTCACTAGCAGAAAACACCAAATCAACCATAGGTCCAAGAACAATTGTCTCTGGAC
GGCAGCTATGCGACTACCGTGCTGTGTGCTGTGTGCCTGCTGCCTGGCAGCCTGGCCCTGCC
GCTGCCTCAGGAGGCGGGAGGCATGAGTGAGCTACAGTGGGAACAGGCTCAG

```

Figura 7. Fragmento del promotor de *MMP7* en *Homo sapiens* (www.ensembl.org). Las bases en color verde claro corresponden al primer exon del gen. Las bases sombreadas en color verde azulado corresponden a los cebadores empleados para la PCR. El cebador sombreado en color gris corresponde a la secuencia del oligonucleótido antisentido empleado en la secuenciación, conservando el cebador directo de la PCR. Sombreadas en amarillo aparecen las repeticiones mononucleotídicas A₇ y A₉.

Para la amplificación del fragmento, se siguió el esquema de reacción de la Figura 8. Se partió de 200 ng de ADN. Se empleó una unidad de *Diamond DNA Polymerase* (Bioline) como enzima polimerasa. Además en la mezcla de reacción se incluyó tampón 10x y cloruro de magnesio a una concentración final de 2,5 mM. Los desoxinucleósidos trifosfato y ambos cebadores se incluyeron a una concentración final de 200 µM. El volumen final de reacción fue de 20 µL.

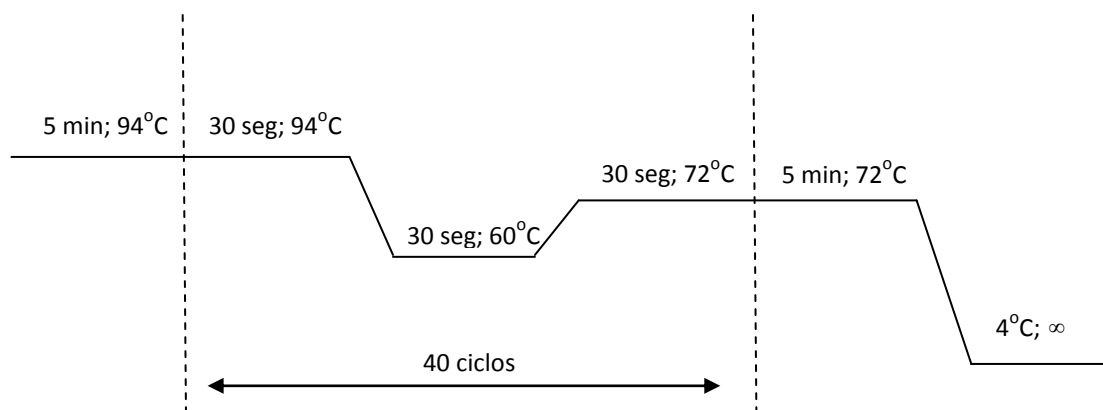


Figura 8. Esquema de la PCR empleada para amplificar el fragmento de interés del promotor de *MMP-7*. El producto resultante es de 278 pares de bases.

6.1 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DE LA PCR DEL PROMOTOR DE *MMP-7*

El producto de PCR se cargó en un gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio. La banda única resultante, a la altura del marcador de 300 pares de bases, fue cortada y purificada siguiendo el protocolo del *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Brevemente, se añadió un volumen de *Buffer QG* equivalente a tres veces el peso de la banda cortada. Se incubó 10 minutos a 50 °C con el fin de disolver la banda de agarosa. A continuación se añadió un volumen de isopropanol frío y la mezcla se pasó a una columna del *kit*. La columna se centrifugó durante un minuto a máxima velocidad. De esta forma el ADN queda retenido en la columna. Para eliminar restos de agarosa, se pasaron 500 µL adicionales del *buffer QG* por la columna. Para lavar, se emplearon 750 µL del *buffer PE* reconstituido con etanol puro, seguido de una centrifugación de 1 minuto a máxima velocidad. En este punto se puede realizar una centrifugación adicional para eliminar totalmente el etanol procedente del lavado. Por último, se eluyó el ADN con 30 µL de agua. La muestra se valoró a 260/280 nm de longitud de onda y se congeló a -20 °C hasta su uso para secuenciación.

7. CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares seleccionadas para llevar a cabo los estudios *in vitro* previstos, fueron todas de cáncer de colon humano, de tipo epitelial y fueron elegidas en función de su clasificación respecto a la estabilidad o no en las secuencias microsatélite. En la categoría de MSI-H, contamos con las siguientes líneas: HCT-116, HCT-15 y RKO (Hope et al, 2008; Gayet et al, 2001; Heinen et al, 1995). En el caso de líneas celulares con baja inestabilidad o estables para las secuencias microsatélites, se dispuso de SW480 y CACO2 (Gayet et al, 2001; Heinen et al, 1995).

Cada línea celular se creció en un medio de cultivo específico. La Tabla 8 resume las características de dichos medios:

Línea celular	HCT-15/HCT-116	RKO
Medio de cultivo	RPMI con glutamina (<i>Gibco</i>), mezcla de DMEM, 10% Fetal Bovine antibióticos (<i>Invitrogen</i>), 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (<i>Gibco</i>), mezcla Serum (FBS) (<i>Gibco</i>), Plasmocin (<i>Invivogen</i>), de antibióticos (<i>Invitrogen</i>), Hepes 10mM, Piruvato sódico 1mM (<i>Gibco</i>), Plasmocin (<i>Invivogen</i>), Hepes Glucosa 4,5 g/L (<i>Sigma</i>)	10mM
Línea celular	SW480	CACO2
Medio de cultivo	DMEM, 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (<i>Gibco</i>), mezcla de antibióticos (<i>Invitrogen</i>), Plasmocin (<i>Invivogen</i>), Hepes 10mM, Glutamina 2mM, Bicarbonato sódico 2,2 g/L	DMEM, 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (<i>Gibco</i>), mezcla de antibióticos (<i>Invitrogen</i>), Plasmocin (<i>Invivogen</i>), Glutamina 2mM, Bicarbonato sódico 2,2 g/L, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, Piruvato sódico 1mM (<i>Gibco</i>)

Tabla 8. Resumen de los distintos medios de cultivo empleados para las líneas celulares seleccionadas.

Las condiciones de cultivo en todos los casos fueron las mismas. Las células fueron mantenidas en incubadores con una temperatura constante de 37 °C y un porcentaje de CO₂ del 5 %.

7.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

La bibliografía ya describe la inestabilidad o no en las secuencias microsatélites de las células (Hope et al, 2008; Gayet et al, 2001; Heinen et al, 1995) con las que se ha trabajado en esta Tesis. Otras características reseñables son que tanto HCT-15, como HCT-116 y SW480 presentan mutaciones en *k-ras* e hipermetilación del promotor de *p16*. Si bien las células HCT-116 solo tienen hipermetilado uno de los alelos, y por otro lado, poseen una mutación que altera el marco de lectura. En esta misma línea celular se han encontrado mutaciones en el gen que codifica para β -catenina, pero no en los correspondientes para p53 y APC. Por el contrario, se detectaron alteraciones para p53 y APC en las líneas HCT-15 y SW480, pero no el gen de β -catenina (Gayet et al, 2001; Heinen et al, 1995). Caco-2 también posee mutaciones en el gen de APC que provocan que la proteína esté truncada (Heinen et al, 1995). Para la línea celular de RKO es destacable mencionar que fue obtenida de un paciente con HNPCC (Hope et al, 2008) y no posee mutaciones en β -catenina, APC ni en TCF-4 (da Costa et al, 1999). No se le conoce activación de la vía WNT en estado basal, en el que tiene bajos niveles de β -catenina. Sin embargo es capaz de responder a medio condicionado con WNT3a activando la señal WNT mediante el complejo LEF1/ β -catenina (Hope et al, 2008).

Todas las líneas celulares fueron previamente caracterizadas en cuanto a sus niveles de expresión para los genes que, mediante los ensayos previos de matrices de oligonucleótidos y PCR cuantitativa a tiempo real, mostraron diferencias significativas entre el grupo de tumores con y sin inestabilidad en microsatélites. El estudio se llevó a cabo mediante la extracción de ARN de las células en cultivo y posterior análisis por PCR cuantitativa a tiempo real.

7.1.1 Extracción de ARN de cultivos celulares

A los platos con células a confluencia se les retiró el medio y se lavaron con PBS. La propia extracción del ARN se llevó a cabo con *TRizol*[®]. Se añadieron 1,5 mL de *TRizol*[®] con los que se recogió toda la monocapa de células y se pasó a un tubo de 2 mL donde se mantuvo cinco minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 300 μ L de cloroformo:isoamílico (24:1) y se agitó vigorosamente, dejando reposar unos tres minutos. La centrifugación a 4 °C a máxima velocidad (13200 r.p.m.) durante quince minutos separó una fase orgánica y una acuosa con el ARN en suspensión. Se recogió la fase acuosa en 750 μ L de isopropanol frío y se dejó precipitando el ARN a -20 °C durante cuatro horas. Pasado ese tiempo, se procedió a una centrifugación a la máxima velocidad durante diez minutos para precipitar el ARN. El *pellet* se lavó con 750 μ L de etanol al 75 % y se dejó secar. El precipitado se resuspendió con 50 μ L de agua libre de nucleasas y se valoró a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm para comprobar posibles contaminaciones con proteínas. Las muestras se guardaron a -80 °C hasta su uso.

7.1.2. Nivel de expresión de los genes seleccionados mediante PCR cuantitativa a tiempo real

El ARN extraído fue transformado en ADNc mediante la reacción de retrotranscripción descrita en el apartado 4.1. Dicho ADNc se empleó en la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real desarrollada a su vez en el apartado 5.2. Se emplearon valores de Δ Ct, obtenidos tras la sustracción del Ct del gen problema con el gen endógeno (*GAPDH*). No se contempló el valor de $\Delta\Delta$ t, ni RQ, al no disponer de células no tumorales.

8. ENSAYOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO

El silenciamiento génico fue desarrollado con *SureSilencing*TM *shRNA Plasmids* de la casa *SuperArray*. La técnica del *shRNA* (*Short Hairpin RNA*) se basa en los *siRNA*

(*Small Interference RNA*). De hecho la maquinaria de la célula rompe el *shRNA* dando lugar a los *siRNA*. Los *siRNA* son junto a los *miRNA* (*MicroRNA*) parte del sistema de moléculas pequeñas de ARN que usan las propias células para controlar qué genes están activos y cómo de activos están. Así, en el caso de los *shRNA* y, por tanto, de los *siRNA*, una molécula de doble cadena de ARN es procesada por la enzima *Dicer* (endoribonucleasa de la familia de las ARNasas tipo III) generando fragmentos cortos de unos 20 nucleótidos. Una de las dos cadenas de cada fragmento, conocida como cadena guía, es incorporada al complejo *RISC* (*RNA Induced Silencing Complex*). Entonces esa hebra guía se une a su secuencia complementaria de ARNm provocando su fragmentación por *Argonaute*, componente catalítico del complejo *RISC* (Figura 9).

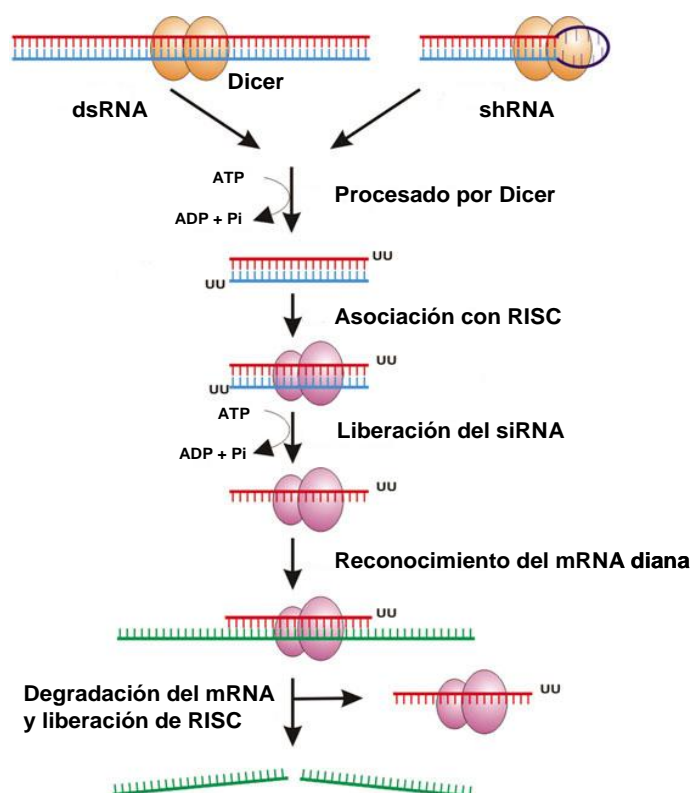


Figura 9. Esquema de procesamiento de los *shRNA* por la enzima *Dicer* y complejo *RISC*. Adaptado de Rutz and Scheffold (*Arthritis Res Ther* 2004).

La técnica de *SureSilencingTM shRNA Plasmids* se trata de un procedimiento en el que cuatro plásmidos con secuencias *shRNA* específicas para el gen en cuestión más

un plásmido denominado control negativo, que está diseñado para no actuar sobre ninguna secuencia codificante, son amplificados y purificados en bacterias. Posteriormente se transfectan en la línea celular de elección y se comprueba el nivel de silenciamiento obtenido por PCR cuantitativa a tiempo real.

Los plásmidos proporcionados por la casa *Superarray* son del tipo *pGeneClipTM*, con secuencias que les hacen resistentes a la puromicina y a la ampicilina. La secuencia de los distintos *shRNA* va insertada entre las posiciones 438 y 439 (TCTC^GCAG). La secuencia insertada debe disponer de una G inicial, si ella misma no la lleva, seguida por la propia secuencia del *shRNA*. A continuación, “CTTCCTGTCA” como *loop* del *shRNA*, la secuencia complementaria del *shRNA* y, por último, las bases CT para crear un nuevo sitio de corte por *Pst I* (Figura 10).

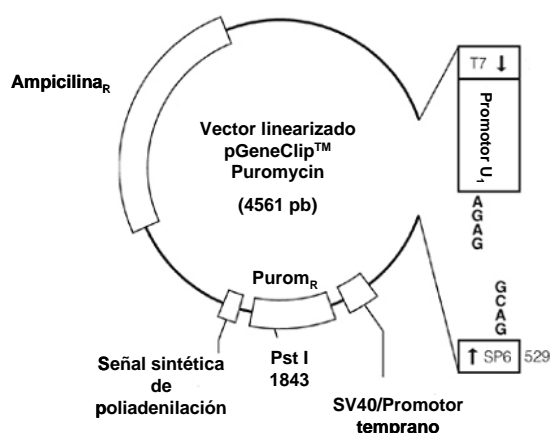


Figura 10. Esquema del plásmido empleado como vehículo para los *shRNA*. Adaptado del protocolo de *Superarray*.

La Tabla 9 resume las secuencias insertadas en el plásmido responsables de inhibir el gen diana. Todas ellas cuentan con una misma secuencia para el plásmido proporcionado como control.

GEN (Cat. Nº)	Secuencia CLON 1	Secuencia CLON 2	Secuencia CLON 3	Secuencia CLON 4	Secuencia CONTROL
PPP2R1B (KH05853P)	TGAGGCCTGT GGTCAGGAAAT	CGAAGTGAA TTGTTGCCATT	GAGCAAATG TTCGCTTCAAT	CTTGGCTCGTG GACCATGTAT	GGAATCTCAT TCGATGCATAC
CSNK1D (KH02098P)	AAAGGCTACC CTCCGAATTT	TCAACTTCTG CTCCAGGAAAT	GAGAGAGCGG AAAGTGAGTAT	TCGACTGGAA CATGCTCAAAT	GGAATCTCAT TCGATGCATAC
TLE3 (KH16044P)	CGAAGAGACT GAACACAATTT	CTCCATGATGG CACCAAAT	CATGGACCC GATAGGTATAAT	CGCCTTATGG AGCCAGCATAT	GGAATCTCAT TCGATGCATAC
FBXW4 (KH16461P)	CTGGCCAAC TCGCATATTGTT	ATGCAGCTAG AGGATGATTCT	AGGATGATT CTCTGTACATAT	TGTACATATCC CAGGCTAATT	GGAATCTCAT TCGATGCATAC
KREMEN2 (KH17550P)	AGGCTACCT GGGATGCTTTGT	TGAGACAGAG GAGGGCATCTA	GGAAACATC TGGTGCTATTAT	TCTCTGGTTTC GGAGGTCTTT	GGAATCTCAT TCGATGCATAC
DVL2 (KH02747P)	CACCATCCC TAATGCCTTTCT	AGTACAATT CCTGGGTATCT	TGGCTGGTGT CCTCAGATAAT	CCTACCATG AGCTTTCATCTT	GGAATCTCAT TCGATGCATAC

Tabla 9. Esquema de las secuencias insertadas en cada uno de los plásmidos así como del número de referencia del producto de la casa *SuperArray*.

8.1 TRANSFORMACIÓN DE LAS BACTERIAS

Las células competentes empleadas para la amplificación de los plásmidos fueron *Escherichia coli* JM109 (*Promega* Cat No. L2001). Se descongelaron las bacterias y se pipetearon 100 µL del *stock* a cinco tubos (uno por cada condición, cuatro para los cuatro plásmidos proporcionados por la casa comercial, más el control negativo). A cada tubo se añadieron 1-50 ng del plásmido correspondiente, mezclando con la punta de la pipeta. Tras un reposo de diez minutos en hielo, se dio un golpe de calor a 42 °C durante 45 segundos y, rápidamente, se pasó a 4 °C durante otros dos minutos.

El siguiente paso fue añadir 900 µL de medio frío LB estéril (*Luria Bertani*; composición para 1L de medio: 10g NaCl, 10g Bactotripton, 5g de extracto de levadura; pH 7). La mezcla resultante se dejó agitando durante una hora a 37 °C a una velocidad de agitación de 225 r.p.m. A continuación, se sembraron las bacterias en placas LB agar con ampicilina (LB estéril con agar al 1,5 %; ampicilina 100 µg/mL) a

varias diluciones con el objeto de obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C.

8.1.1 Comprobación de la transformación bacteriana

Tras incubar durante toda la noche las bacterias transformadas, se tomaron colonias aisladas y se dejaron crecer en 2,5 mL de medio LB estéril con ampicilina 50 µg/mL, incubando de tres a seis horas con agitación y a 37 °C. De ahí se tomaron 1,5 mL para comprobar que las bacterias han sido correctamente transformadas por medio de una purificación a baja escala empleando el kit *EndoFree[®] Plasmid Purification* de *Qiagen*. Dicho volumen se centrifugó durante un minuto a 12000 r.p.m., a temperatura ambiente, y se retiró el sobrenadante. El *pellet* de bacterias resultante se resuspendió con 300 µL del reactivo P1 (tampón de resuspensión), conservado en nevera y al que previamente se le añade la solución ARNasa A (concentración final de 100 µg/mL). Seguidamente se añaden otros 300 µL del reactivo P2 (reactivo de lisis), agitando bien. La mezcla se deja reposar cinco minutos a temperatura ambiente. A continuación se añaden otros 300 µL del reactivo P3 frío (tampón de neutralización), se agita bien y se deja diez minutos en hielo. Tras ese tiempo se centrifuga a máxima revolución durante diez minutos. De este paso, se recoge el sobrenadante al que añadimos 700 µL de isopropanol frío para precipitar el ADN plasmídico (el ADN genómico, proteínas y restos celulares precipitaron en la centrifugación posterior a la adición del reactivo P3). En este paso, se puede dejar precipitando el ADN a -20 °C durante una hora. De nuevo, procedemos con una centrifugación de diez minutos a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante. El precipitado obtenido es el ADN plasmídico, que pasamos a lavar con etanol al 80 %, con nueva centrifugación de 5 minutos a temperatura ambiente. Por último se deja secar el *pellet* y se resuspende con 20 µL de agua y se valora espectrofotométricamente a 260/280 nm.

Según el protocolo de la casa comercial, el plásmido puede ser cortado por la enzima de restricción Pst I generando dos fragmentos, uno de 3209 pares de bases y otro de 1402. Para llevar a cabo la digestión, se incubó el ADN plasmídico precipitado

con Pst I durante una hora a 37 °C. Las cantidades de reacción fueron 1 µg de ADN, 2,5 µL de tampón H, una unidad enzimática de Pst I (10 U/µL) y agua en cantidad suficiente para llegar a un volumen final de 20 µL por reacción. El producto de reacción se desarrolló en un gel de agarosa al 0,8 % a 120 V durante cuarenta y cinco minutos, comprobando la presencia de las dos bandas mencionadas.

8.2 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

Una vez comprobado a pequeña escala que las colonias de bacterias seleccionadas tienen los plásmidos correspondientes, se procedió a su obtención a gran escala. Así, el resto del volumen de los 2,5 mL que se crecieron por espacio de tres a seis horas a 37 °C con agitación, fueron pasados a un matraz con 250 mL de LB estéril con ampicilina 50 µL/mL que se incubó a 37°C toda la noche.

Para la purificación del plásmido se siguió el procedimiento del kit *EndoFree[®] Plasmid Purification* de *Qiagen*. El contenido del matraz se pasó a tubos adaptados para tal volumen, y se centrifugó a 6000 g durante 15 minutos a 4 °C. Con ello se precipitaron las bacterias, y el *pellet* formado se resuspendió en 10 mL del reactivo P1. A continuación, se añadió el mismo volumen de reactivo P2, se mezcló e incubó por espacio de cinco minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo las bacterias fueron lisadas, liberando el contenido intracelular. Pasado este tiempo, se adicionaron otros 10 mL del reactivo de neutralización P3, mezclando 4-6 veces y se pasó directamente a unos cartuchos donde se incubó diez minutos a temperatura ambiente. En este tiempo se formó una masa viscosa de ADN genómico, proteínas y restos celulares. Así, la mezcla formada se hizo pasar con ayuda de un émbolo por el cartucho, recogiendo el filtrado en un tubo de 50 mL. A este volumen se le añadieron 2,5 mL de volumen de tampón *ER (Endotoxin Removal buffer)* y se dejó incubando treinta minutos a 4 °C. En el tiempo de incubación, se añadieron 10 mL de QBT a una columna que se dejaron pasar por acción de la gravedad con el fin de equilibrarla. Una vez finalizada la incubación, se filtró la mezcla por la columna y se realizaron dos lavados con 30 mL del tampón QC.

Para eluir el ADN que ha quedado retenido en la columna, se añadieron 15 mL del reactivo QN que, una vez filtrados se recogieron en un tubo al que se añadió un volumen de 10,5 mL de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló y se centrifugó a más de 15.000 g durante treinta minutos a 4 °C. El precipitado, el ADN plasmídico, se lavó con 5 mL de etanol al 70 %, con una centrifugación de diez minutos a la misma velocidad. Tras secar el *pellet*, se resuspendió en 250 µL de tampón TE. Se valoró y se comprobó de nuevo la presencia del ADN plasmídico correcto con la incubación con Pst I descrita en el apartado 6.1.1. Una vez hecha la verificación se guardó a -20 °C hasta su posterior uso.

8.3 TRANSFECCIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

Una vez purificados los plásmidos, se procedió a la transfección en líneas celulares de cáncer de colon humanas. La transfección, introducción de material genético en células eucariotas, puede ser estable o transitoria dependiendo de la integración o no de dicho material en el genoma del receptor. En este trabajo se optó por transfecciones estables, y para ello se seleccionaron aquellas células que sí habían incorporado el plásmido transfectado. Dado que los plásmidos poseen resistencia a puromicina, se empleó este antibiótico para la selección. Por ello, previo a la transfección, se realizó una curva de sensibilidad a la puromicina para cada línea celular. Dicha curva se desarrolló a diferentes concentraciones de puromicina (0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL) y se consideró aquella concentración mínima a la que las células morían (determinación por medio de una incubación con cristal violeta y SDS, seguida de la valoración de la absorbancia con cristal violeta a 500nm). Se determinó que las líneas celulares HCT-116 y RKO fueron sensibles a 1 µg/mL de puromicina, y las HCT-15 a 10 µg/mL. Posteriormente, se utilizaron varios métodos de transfección con el fin de averiguar aquél con el que las células se transfectaban con un mayor porcentaje de éxito. Los distintos métodos vienen detallados a continuación.

8.3.1 Transfección por electroporación (*Amaxa*[®])

La electroporación consiste en abrir pequeños poros en la membrana de las células por los que introducir el material genético. Técnicamente, consiste en preparar las células suspendidas en medio de cultivo en una cubeta con electrodos a los lados. A la cubeta se le añade el plásmido y se aplica una descarga de corriente eléctrica.

El protocolo de la casa comercial *Amaxa*[®] sugiere emplear un medio de cultivo bajo en iones calcio para no interferir en la corriente eléctrica aplicada, como es el RPMI. Se partió de 10^6 células para cada transfección. Para ello, se tripsinizó un plato de cultivo que debía estar a un 70-85 % de confluencia. Se resuspendieron en un volumen suficiente de medio y se contaron el número de células. A partir de ese cálculo, se conoció la concentración de células por mL de volumen. Se prepararon entonces las correspondientes alícuotas, en función de los *shRNA* a transfectar, con 10^6 células cada una y se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante cinco minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células con la solución para la transfección que proporciona la casa comercial y que es específica para cada línea celular. A esta suspensión se le añadieron 2 µg de cada uno de los plásmidos en cada una de las alícuotas. La mezcla se pasó a la cubeta con los electrodos y se llevó al electroporador de *Amaxa*[®], empleando el programa específico para dicha línea celular. A continuación, se siembran las células en un plato previamente preparado con medio de cultivo.

8.3.2 Transfección por liposomas catiónicos

Se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y el ADN, que son afines por las membranas celulares, permitiendo la entrada del ácido nucleico en el citosol.

8.3.2.1 Lipofectamine[™] 2000 Reagent (Invitrogen)

Se prepararon las células a un 65 % de confluencia y se les retiró el suero y los antibióticos antes de la transfección. Se diluyen 10 µL de *Lipofectamine*[™] 2000 en 250

μL de medio de transfección (medio sin antibióticos ni suero) y se deja cinco minutos a temperatura ambiente. En otros 250 μL de medio de transfección se diluyen 4 μg del ADN a transfectar, se juntan ambos tubos y se deja otros diez minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añade al plato con las células en cultivo y pasadas cuatro o seis horas se pueden retirar los complejos de transfección.

8.3.2.2 FuGene[®] HD Transfection Reagent (Roche)

Las células se prepararon a un 80% de confluencia, sin antibióticos ni suero previo a la transfección. Se diluyeron 4 μg del plásmido a transfectar en 100 μL de medio de transfección. A continuación se añadieron 8 μL de *FuGene[®] HD*, se mezcló todo bien y tras una incubación de quince minutos a temperatura ambiente, se añadió todo al plato con las células en cultivo. Si bien no es necesario retirar los complejos de transfección, éstos se retiraron a las veinticuatro horas.

8.3.3 Transfección con nanopartículas asistidas por imán (MA Lipofection[®] Enhancer)

En este tipo de transfección, los ácidos nucleicos son forzados a pasar al interior celular asociados con partículas magnéticas que, empleadas junto con uno de los métodos tradicionales de transfección de liposomas catiónicos, incrementa el rendimiento final del proceso.

El procedimiento a seguir consiste en sembrar las células para que estén entre un 30 – 60 % de confluencia en el momento de la transfección. Para placas de 6 pocillos, se prepararon 3 μg de shRNA diluidos en 200 μL de medio de transfección (sin antibióticos ni suero). En un tubo aparte se preparan 9 μL de *FuGene[®] HD* o de *LipofectamineTM 2000* en 200 μL de medio de transfección. A continuación se mezclan los tubos y se dejan 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se añaden 3 μL de *MA Lipofection[®] Enhancer (IBA GmbH BioTAGnology)*, previa agitación del tubo para que las partículas magnéticas se resuspendan bien. Se mezcla bien con la pipeta y se deja otros 15 minutos de incubación a temperatura ambiente. Por último, y ya en el incubador

a 37 °C, se incubó la placa con el imán (*Universal Magent Plate MATra*, IBA GmbH *BioTAGnology*) durante 10 minutos. A las 24 horas se cambia el medio a medio normal de cultivo y a las 48 horas se incuban con medio de selección.

8.4 COMPROBACIÓN DEL GRADO DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA VÍA WNT TRATADOS CON *shRNA*

Las células transfectadas por los diferentes mecanismos fueron mantenidas y seleccionadas en sus correspondientes medios de cultivo con la concentración de puromicina a la que resultaron ser sensibles. Tras un mínimo de dos semanas de selección, se extrajo el ARN de las células para comprobar por PCR cuantitativa el nivel de silenciamiento obtenido con el *shRNA* (procedimiento previamente descrito en el apartado 6.1 de Material y Métodos de esta Tesis).

8.4.1 Nivel de silenciamiento de los genes tratados con *shRNA* en cultivo celular mediante PCR cuantitativa tiempo real

El ARN extraído de los clones de células silenciados con *shRNA* fue transformado en ADNc mediante la reacción de retrotranscripción descrita en el apartado 4.1. Entonces el ADNc se empleó en la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real desarrollada a su vez en el apartado 5.2. En esta ocasión, se tomó como muestra de referencia considerada de expresión “normal” el clon celular resultante de la transfección con el plásmido control (aquel cuyo inserto no codifica para ninguna secuencia de ARNm). Se consideraron como válidos aquellos clones que, al menos, demostrasen un porcentaje de silenciamiento génico de un 70-80 %.

9. ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA WNT CON WNT3a EN LÍNEAS CELULARES TRANSFECTADAS CON *shRNA*: TCF REPORTER ASSAY

Con el objetivo de comprobar la implicación de los genes seleccionados, con expresión diferencial entre cánceres colorrectales MSI-H y MSI-L/MSS en la regulación

de la vía WNT, se procedió al uso de la herramienta *SignalTM Reporter Assay* (SABiosciencesTM).

Se trata de una técnica sensible y cuantitativa que permite el estudio de la activación de vías de transducción de señales. Básicamente, se trata de una construcción con promotor tipo caja TATA unido a una serie de secuencias repetitivas del factor transcripcional TCF4, conocidas como elemento de respuesta transcripcional (*TRE, Transcriptional Response Element*) (Figura 11A). TCF4 es un factor transcripcional exclusivo de la vía WNT. Bajo el control de este promotor se incluye un gen que codifica para el gen de *Luciferasa* de luciérnaga (*Firefly luciferase*). Esta construcción sería la encargada de monitorizar el incremento o descenso en la señalización de la vía, y se la conoce como el *reporter*. Como control interno de transfección (Figura 11B), esta construcción va acompañada de otra que cuenta con un promotor de activación constitutiva CMV (citomegalovirus) seguido de un gen para la expresión de *Renilla luciferase*.

Como control negativo, el *kit* incluye otra pareja de plásmidos. Uno de ellos es una construcción sin ningún TRE y con un promotor caja TATA, que resulta no inducible (Figura 11C). El otro elemento es el mismo control interno empleado con el *reporter*.

Por último, como control positivo del ensayo, se dispone de un conjunto de construcciones: la responsable del control interno de transfección que expresa para la luciferasa de *Renilla*, y otros dos plásmidos que también expresan constitutivamente *Firefly Luciferase* y *Monster GFP* (MGFP), respectivamente, gracias a un promotor CMV (Figura 11D y 11E).

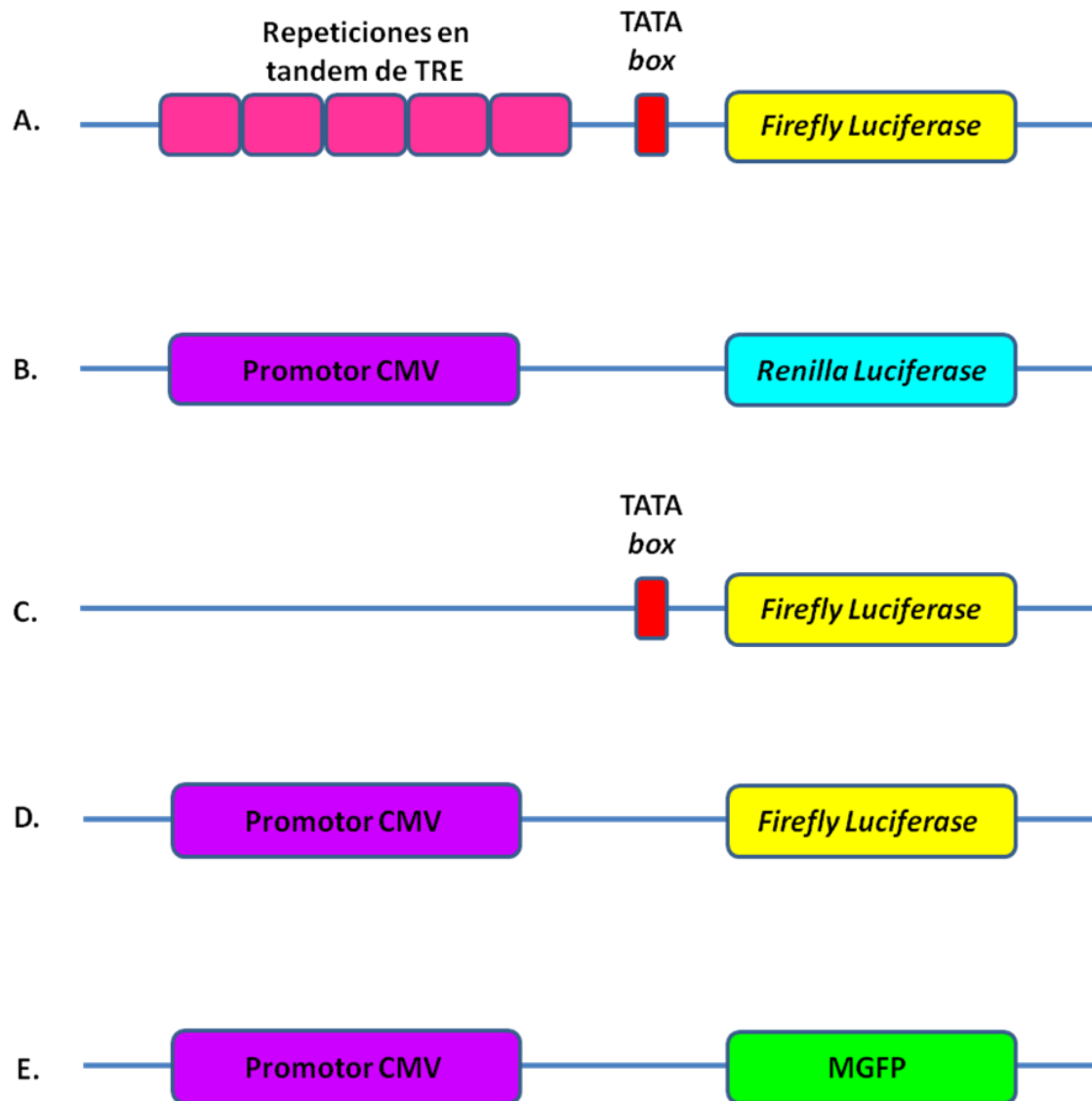


Figura 11. Esquema de las distintas construcciones empleadas en el protocolo de técnica *SignalTM Reporter Assay*. La construcción A representa el *reporter* que medirá la mayor o menor activación de la vía. B constituye el elemento de control de transfección. C actúa como control negativo. Las construcciones D y E son los controles positivos al estar constitutivamente activas. Adaptado del protocolo *SignalTM Reporter Assay*.

9.1 PROTOCOLO DE TRANSFECCIÓN PARA EL *TCF REPORTER ASSAY*

El protocolo a seguir fue el descrito en el manual de la casa comercial. La Figura 12 muestra un esquema global del procedimiento. Tras la transfección se procedió al estímulo de la vía con un ligando apropiado y a su posterior análisis. Estos dos eventos se describirán en los apartados detallados a continuación (9.2, 9.3).

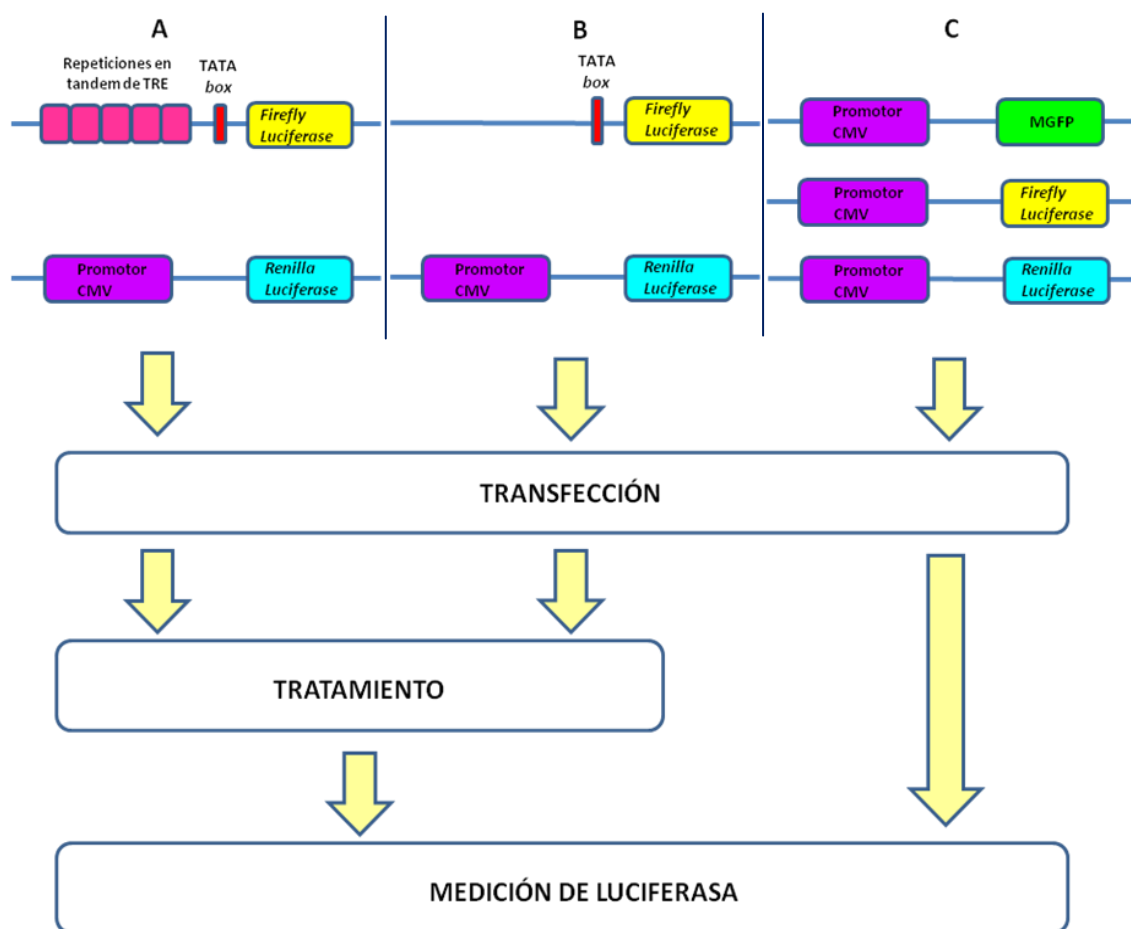


Figura 12. Dibujo esquemático del procedimiento del ensayo TCF *reporter*. A, mezcla de reacción con el *reporter* y el control interno de transfección. B, control negativo (sin TRE), con su correspondiente control interno de transfección. C, mezcla de construcciones de activación constitutiva para MGFP, *Firefly Luciferase* y *Renilla Luciferase*. Adaptado del protocolo *Signal™ Reporter Assay*.

En primer lugar se procedió a la siembra de las células en placas de 96 pocillos de fondo transparente y paredes opacas con tapa (Costar® 3603). Se sembraron las

células en un número de 2×10^4 células por pocillo. Para ello, se contaron las células procedentes de un plato de cultivo con ayuda de una cámara de Neubauer. De acuerdo a la fórmula $\text{n}^\circ \text{ células/mL} = \text{n}^\circ \text{ células contadas} \times 10^4$, se hizo una dilución hasta obtener una concentración de 200 células/ μL . De este modo se dispensaron, 100 μL a cada pocillo, que equivale a 2×10^4 células.

Una vez se habían pegado las células se procedió a la transfección de las diferentes construcciones. Previo al procedimiento, se retiró a las células el medio de cultivo y se puso medio de cultivo nuevo sin antibióticos (50 μL para transfecciones con *Lipofectamine*TM 2000 o 95 μL para transfecciones con *Fugene*[®] HD). Cada una de las transfecciones se realizó en pocillos por triplicado. Se preparó una mezcla de reacción para cada tipo de transfección en función del diferente número de pocillos ocupados en cada ensayo según el siguiente esquema, de acuerdo con el protocolo de la casa comercial:

a) Transfección del *reporter* o del control negativo: La transfección se realizó con *Lipofectamine*TM 2000 Reagent (Invitrogen) o con *FuGene*[®] HD (Roche).

a.1) Según el protocolo de *Lipofectamine*TM 2000 Reagent (Invitrogen), se emplean 0,25 μL del agente de transfección por cada 100 ng de ADN a transfectar, diluidos en otros 25 μL de medio por pocillo. Por otro lado, se diluye 1 μL (100 ng) del *reporter* o del control negativo en 25 μL de medio de transfección por cada pocillo (medio de transfección sin antibiótico y sin suero). Se prepara el mismo número de pocillos para ambos casos, por lo que los cálculos son equivalentes. Después se juntan ambas diluciones y se deja 15 minutos de incubación, pasados los cuales se dispensan 50 μL a cada pocillo. Los pocillos previamente tenían otros 50 μL de medio con lo que el volumen final es de 100 μL .

a.2) Para el caso de la transfección con *Fugene*[®] HD (Roche), el protocolo recomienda emplear 0,4 μL del agente de transfección por cada 1 μL (100ng) de *reporter* o control negativo, diluyendo hasta un volumen final de 5 μL por cada pocillo. La mezcla se incubaba también 15 minutos a temperatura

ambiente. Se dispensan 5 μ L a cada pocillo que ya tenía 95 μ L de medio, hasta un volumen final de 100 μ L.

b) Transfección del control positivo: se empleó un control positivo para cada uno de los clones de células utilizados.

b.1) De nuevo se dispuso de 1 μ L (100 ng) de control positivo diluido en 25 μ L de medio y otros 0,25 μ L de *Lipofectamine*TM 2000 en otros 25 μ L de medio, que se incubaron los correspondientes 15 minutos a temperatura ambiente, pasados los cuales, se adicionaron a los pocillos correspondientes.

b.2) Si la transfección se realizó con *FuGene*[®] HD, se diluyeron los 100 ng de ADN del control positivo con 0,4 μ L de *FuGene*[®] HD en 5 μ L de medio, que se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadieron a la placa 5 μ L por cada pocillo.

Las células se incubaron un mínimo de 4 a 6 horas con los complejos de transfección; pasados este tiempos se procedió al inicio del estímulo de la vía WNT a diferentes tiempos.

9.2 ESTÍMULO CON WNT3a SOBRE CÉLULAS TRANSFECTADAS CON TCF REPORTER

Una vez retirados los complejos de transfección, se procedió a realizar un estudio de la posible activación de la vía por medio del *TCF Reporter Assay*, con la ayuda de *Recombinant Human Wnt3a CF (Carrier Free) (R&D Systems)*. Se trata de una proteína recombinante del WNT3a humano, ligando WNT descrito como activador de la vía WNT canónica. Así, se ensayaron las células a distintos tiempos: 24, 48 y 60 horas. La concentración de estímulo empleada fue de 400 ng/mL. Como consecuencia de este tipo de ensayo, las células debían estar previamente sin suero para evitar estímulos no inducidos por la proteína WNT3a recombinante. El estímulo, por tanto, se fue añadiendo a los distintos pocillos, a lo largo del tiempo, para la lectura simultánea de todas las muestras.

9.3 LECTURA DE LA EXPRESIÓN DE *LUCIFERASE* DEL *TCF REPORTER ASSAY* EN RESPUESTA AL ESTÍMULO CON LA PROTEÍNA WNT3a RECOMBINANTE HUMANA

Para el revelado del ensayo se empleó el *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems (Promega)*. Este protocolo permite la detección de las dos luciferasas, la de *Firefly* y la de *Renilla*, de forma secuencial a partir de una sola muestra, gracias al uso de dos sustratos distintos para la detección de cada una de las proteínas. Así, se emplea primero el *Luciferase Assay Reagent II (LAR II)* para *Firefly luciferase*. El siguiente paso es el *Stop and Glo[®] Reagent*, que detiene la reacción anterior e inicia la de *Renilla luciferase*. Tanto el LAR II como el *Stop and Glo[®] Reagent* deben atemperarse previamente a temperatura ambiente.

El primer paso, según el procedimiento a seguir de la casa comercial, es la lisis de las células en cultivo de la placa en ensayo. Para ello se emplea el *Passive Lysis Buffer (PLB)* del *kit*. Este reactivo se adquiere a una concentración 20x y debe emplearse 1x. Tras la dilución correspondiente con agua, se añadieron 20 µL del PLB 1x a cada uno de los pocillos. Esto se mantuvo con agitación durante 15 minutos, a temperatura ambiente.

A continuación, se preparó el LAR II. Este reactivo viene liofilizado (*Luciferase Assay Substrate*) y se reconstituye con 10 mL del *Luciferase Assay Buffer II*. El LAR II puede mantenerse a -20 °C durante un mes, o bien alicuoteado a -80 °C hasta un año. Se añaden 100 µL del LAR II a cada pocillo, mezclando dos o tres veces con la pipeta. Se mide la emisión de luminiscencia con el luminómetro *FLUOstar Omega* de *BMG LabTech*.

Una vez efectuada la medida, se detiene la reacción con el *Stop and Glo[®] Reagent*. Este reactivo viene como 50x *Stop and Glo[®] Reagent*, y debe diluirse al 1x con el *Stop and Glo[®] Buffer*. Se emplearon 100 µL de este reactivo por cada pocillo. Se agita brevemente y se inicia la lectura de *Renilla luciferase*.

9.4 ANÁLISIS DE LA LECTURA DE LUMINISCENCIA DE LUCIFERASA

La lectura de ambas luciferasas (*Firefly* y *Renilla luciferase*) se realiza mediante el Omega software versión 1.10. Así, se recogen los datos sin tratar medidos directamente por el filtro de luminiscencia del luminómetro. Mediante el *Omega-MARS Data Analyses Software* versión 1.10 es posible el análisis de datos. Dicho programa ofrece, además, la posibilidad de sustraer la lectura de fondo que puedan emitir células no transfectadas, o incluir datos promedio entre los diferentes triplicados.

El proceso matemático al que se sometieron cada uno de los datos fue el siguiente. Previo a todo análisis, a cada una de las muestras se le sustrajo la lectura de los pocillos considerados como blanco (células sin transfectar y sin estímulo). Después, cada una de las lecturas medidas para *Firefly luciferase* se normalizó mediante división con el dato de *Renilla luciferase* de ese mismo pocillo. Así, se consigue normalizar con su correspondiente control interno de transfección. A continuación se hace la media de los triplicados de los pocillos. Este procedimiento se llevó a cabo con todos los casos, incluyendo el *reporter* y los controles positivos y negativos. Entonces, a los valores obtenidos para cada uno de los tiempos del *reporter* se les restó el valor de la lectura de su correspondiente control negativo. Por último, y para el análisis en los diferentes tiempos del ensayo, los valores del *reporter* a las 24 h, 48 h y 60 h fueron referenciados a su correspondiente tiempo cero de la estimulación mediante división. Con estos datos, se pueden analizar las diferencias de activación de cada clon celular considerado, a cada uno de los tiempos ensayados, respecto a células sin estimular. Para saber el grado de activación o inhibición de la vía en el clon con el gen silenciado, respecto al clon control, se realizó una división y se calculó el consiguiente porcentaje.

9.4.1 Análisis estadístico del ensayo *TCF Reporter*

Se empleó la *t-Student* o U de *Mann-Whitney* para investigar diferencias entre los distintos tiempos ensayados, según los datos se acoplasen a una distribución normal o no. Para el estudio de normalidad de los datos se empleó el test de *Shapiro-Wilk*.

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE TUMORES COLORRECTALES

OBJETO DE ESTUDIO

Según lo descrito en el apartado 3 de Material y Métodos, se procedió a clasificar la población de tumores colorrectales esporádicos objeto de investigación según el grado de inestabilidad en secuencias microsatélite. De esta forma, si la muestra tumoral tenía dos o más de los marcadores descritos en dicho apartado alterados, se clasificaba como MSI-H (alta inestabilidad); y si presentaba un marcador con inestabilidad o ninguno, la muestra se clasificaba en el grupo MSI-L/MSS (baja inestabilidad o estable). En total se dispuso 12 muestras tumorales MSI-H y 36 MSI-L/MSS.

Solo nos fueron facilitados, parcialmente, los datos clínicos de los pacientes con tumores estables o de baja inestabilidad para microsatélites. Las características de este grupo quedan recogidas la Tabla I. Además se dispuso de los datos clínicos correspondientes a recidivas tumorales en 26 de los casos MSI-L/MSS. De estos, 5 fueron clasificados como positivos (19,23 %). El periodo de seguimiento de la serie para estudios de supervivencia fue de 0 a 84 meses. En el caso del grupo de tumores de alta inestabilidad, no se dispuso de datos clínicos.

	ESTADIO DE DUKES				TAMAÑO DEL TUMOR				GRADO DE INVASIÓN GANGLIONAR (N)			METÁSTASIS A DISTANCIA		LOCALIZACIÓN		
	A	B	C	D	T1	T2	T3	T4	N0	N1	N2	M0	M1	Colon Izdo	Colon Dcho	Recto
MSI-L/MSS	6	13	8	7	-	7	25	1	21	9	3	12	6	4	10	17
TOTAL	34				33				33			18		31		

Tabla I. Clasificación según el sistema Dukes y el AJCC.

2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA VÍA WNT

2.1 ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA VÍA WNT MEDIANTE EL USO DE MATRICES DE OLIGONUCLEÓTIDOS

El estudio de expresión génica se llevó a cabo empleando membranas de oligonucleótidos sobre las que se hibridó ARNm procedente de los tumores considerados. Este ARNm fue previamente marcado y, tras una reacción luminiscente, se obtuvieron datos de expresión. El principal objetivo fue comparar los niveles de expresión entre el grupo de muestras clasificadas como MSI-H y los tumores MSI-L/MSS. A su vez se hibridó una membrana con un *pool* de diez muestras no tumorales. Para el análisis de los resultados obtenidos se empleó el programa informático *online GEMArray Expression Analysis Suite 2.0* de la casa *Superarray*. Este programa cuantifica la señal obtenida para cada uno de los genes representados en la membrana y da la posibilidad de normalizarlos con genes que están en la propia membrana. En la Tabla II podemos observar la distribución esquemática de los genes estudiados.

Un gen normalizador o *Housekeeping Gene* es aquel que mantiene una expresión constante y estable, pues es esencial para el funcionamiento de las células. Las membranas ofrecen varias posibilidades de gen normalizador. De esta forma, se puede seleccionar aquel que conserve en mayor medida su expresión en todos los casos. En nuestro caso, se eligió *GAPDH* como gen normalizador. Así el programa corrigió los datos en función de la expresión de este gen. Una vez los datos normalizados se generó un *scatter plot* con los valores obtenidos a partir de los tumores clasificados como MSI-H frente a los tumores MSI-L/MSS. Como definición del umbral de selección se consideró una diferencia de, al menos, 2,5 veces entre ambos grupos. Este procedimiento originó una nube de puntos (Figura I) que representaba una serie de genes cuya expresión en el grupo de inestabilidad en microsatélites era mayor a la del grupo con estabilidad. La Tabla III muestra las diferencias significativas

de expresión génica entre los dos tipos tumorales que se consideran así como la referencia de dichos genes.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	RPS27A	AES	APC	APC2	AXIN1	AXIN2	BCL9	BTCR
2	CCND1	CCND2	CCND3	CSNK1A1	CSNK1A1L	CSNK1D	CSNK1G1	CSNK1G2
3	CSNK1G3	CSNK2A1	CSNK2A2	CSNK2B	CTBP1	CTBP2	CTNNB1	CTNNBIP1
4	CXXC4	DAAM1	DAAM2	DIXDC1	DKK1	DKK2	DKK3	DKK4
5	DVL1	DVL2	DVL3	EP300	FBXW11	FBXW2	FGF4	FOSL1
6	FOXP1	FRAT1	FRAT2	FRZB	FSHB	FZD1	FZD10	FZD2
7	FZD3	FZD4	C2orf31	FZD6	FZD7	FZD8	FZD9	GSK3A
8	GSK3B	JUN	KREMEN1	KREMEN2	LEF1	LRP5	LRP6	MARK4
9	MYC	NKD1	NKD2	NLK	PITX2	PORCN	PPP2CA	PPP2CB
10	PPP2R1A	PPP2R1B	PYGO1	PYGO2	RHOU	SEN2	SFRP1	SFRP4
11	SFRP5	SHFM3	SCL9A3R1	SOX17	T	TCF7	TCF7L1	TCF7L2
12	TLE1	TLE2	TLE3	TLE4	WIF1	WISP1	WISP2	WNT1
13	WNT10A	WNT10B	WNT11	WNT16	WNT2	WNT2B	WNT3	WNT3A
14	WNT4	WNT5A	WNT5B	WNT6	WNT7A	WNT7B	WNT8A	WNT8B
15	WNT9A	WNT9B	PUC18	Blanco	Blanco	AS1R2	AS1R1	AS1
16	GAPDH	B2M	HSPCB	HSPB	ACTB	ACTB	BAS2C	BAS2C

Tabla II. Esquema de los genes relacionados con la vía Wnt representados en la membrana de oligonucleótidos utilizada para llevar a cabo los análisis de expresión génica. Los genes resaltados en negrita representan las diferentes opciones para la normalización de los datos. Las celdas rayadas constituyen el blanco de la membrana.

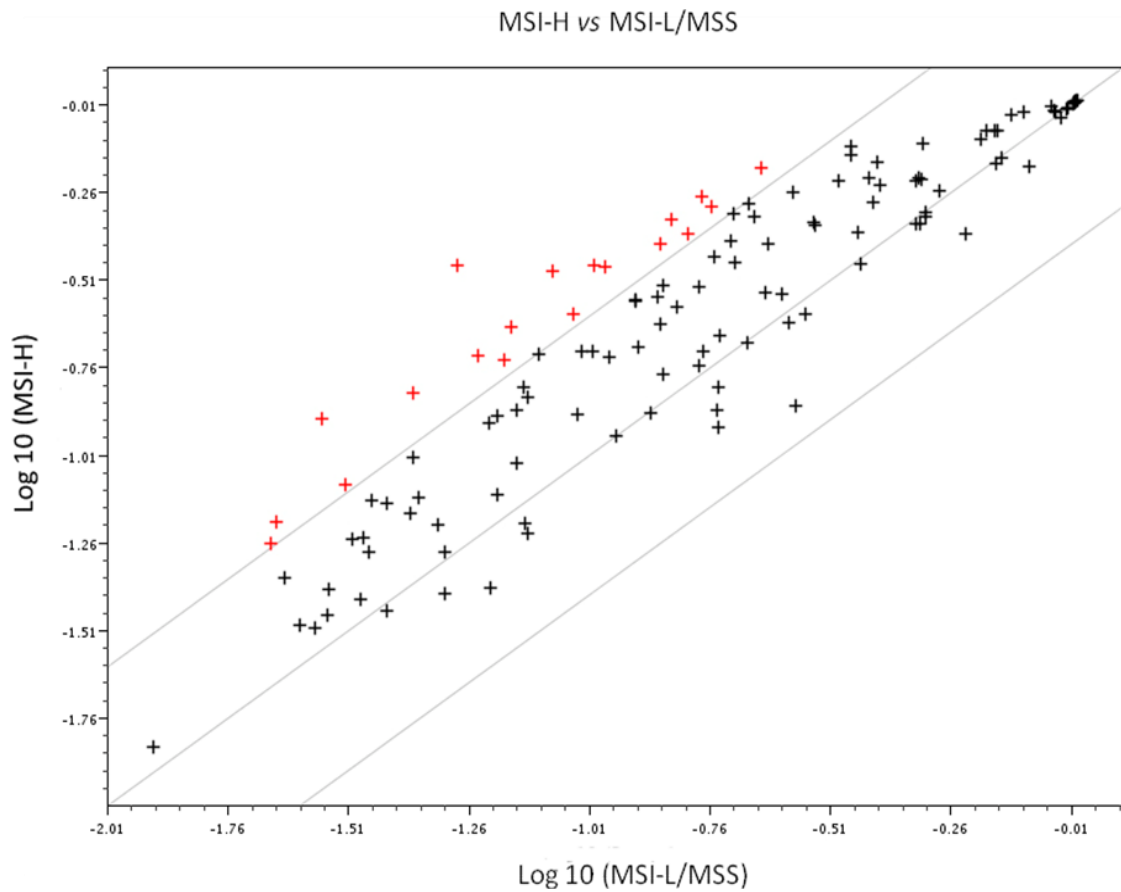


Figura I. *Scatter plot* que representa las diferencias de expresión entre el grupo 1 (MSI-L/MSS) y el grupo 2 (MSI-H) con una diferencia de $\pm 2,5$ veces. Las cruces rojas representan los genes cuya expresión supera el umbral fijado.

Gen	Diferencias de expresión MSI-H vs MSI-L/MSS (Nº de veces)	Valor P
<i>CSNK1D</i>	2,90	0,040
<i>CTNNB1</i>	3,20	0,003
<i>CTNNBIP1</i>	2,88	0,007
<i>DVL2</i>	4,57	0,030
<i>FRAT2</i>	4,00	0,015
<i>GSK3B</i>	3,21	0,023
<i>KREMEN2</i>	6,52	0,011
<i>PPP2R1B</i>	3,19	0,000
<i>FBXW4</i>	3,42	0,012
<i>TLE2</i>	3,28	0,020
<i>TLE3</i>	2,65	0,007
<i>WIF1</i>	3,38	0,045
<i>CXXC4</i>	2,47	0,020

Tabla III. Genes cuya expresión difiere en $\pm 2,5$ veces y que muestran diferencias significativas entre el grupo MSI-H y el grupo MSI-L/MSS, tras el análisis de las matrices de oligonucleótidos para el estudio de la vía WNT.

El programa informático utilizado proporcionó otros datos a partir del análisis de los *arrays*. Así se obtuvo el *clustergram*, que consiste en un diagrama basado en un código de color. Los colores en la gama verde indican unos niveles bajos de expresión en diferentes grados, mientras que la gama de color rojo refiere niveles de expresión elevados. El color negro representa la media de expresión. El *clustergram* de la Figura II se generó considerando los niveles de expresión de cada gen individual en las distintas muestras analizadas, estableciendo como rango de expresión la variación que experimenta dicho gen en todos los casos ensayados. Es decir, la variabilidad de expresión se representa únicamente respecto a ese gen considerando todas las muestras. La ventaja de este análisis consiste en la posibilidad de agrupar los casos individuales de la población en función de la expresión de los diferentes genes. Así, como se aprecia en la Figura II, los tumores MSI-H presentan en su mayoría niveles de expresión más altos, y aparecen además agrupados entre sí. Por otro lado, los genes

aparecen unidos mediante un dendograma según el coeficiente de correlación. Dicho coeficiente se usa para expresar similitud, de modo que los genes más similares se unen en alturas más bajas y los que muestran mayores diferencias en puntos más altos.

Otra opción consiste en la posibilidad de representar el *clustergram* en función de la expresión relativa de los genes respecto a cada una de las muestras individualmente. Es decir, en este caso, el rango de expresión se consideraría para todos los genes en esa muestra individual. Sin embargo, esta alternativa no nos resultó tan útil, pues no aportaba información relativa a la agrupación de los casos, sino que se centra más en las diferencias de expresión de los genes sin atender a las características de las muestras.

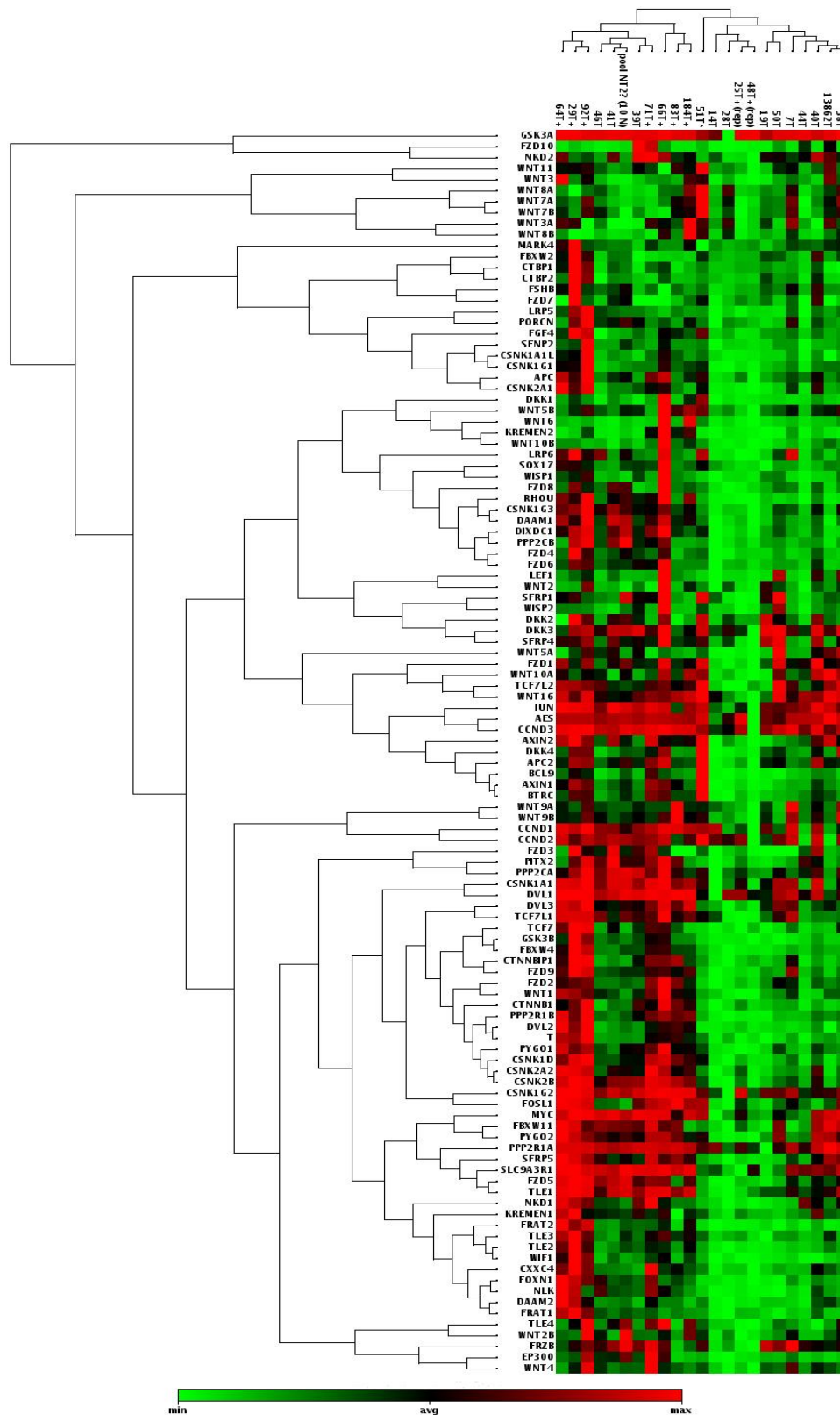


Figura II. *Clustergram* de las membranas de oligonucleótidos de la vía WNT. El código de color está introducido en función de la expresión del gen en relación a todas las muestras. Las muestras MSI-H (diferenciadas con el símbolo “+”) aparecen agrupadas a la izquierda del *cluster*.

El programa informático, a su vez, ofrece la posibilidad de agrupar los genes en *clusters* (grupos) en función de la similitud en los patrones de expresión. La fórmula matemática empleada a tal efecto está basada en el método de la distancia euclídea. Los genes entonces quedaron agrupados según su “proximidad” en cuanto a nivel de expresión (Figura III) y cada uno de ellos quedó identificado en la Tabla IV. Los genes del *cluster* 1, representados en la Figura III en rojo, son los de menor expresión y constituyen la agrupación más homogénea. Como apunte reseñable, aparecen agrupados en este cluster la mayoría de los ligandos Wnt y los receptores Frizzled. Los pertenecientes a los *clusters* 2 y 3, en la Figura III, son los de mayor expresión. Son los que presentan una mayor heterogeneidad. En dicha Figura III podemos ver el diferente grado de expresión para los 114 genes en todas las muestras. Llamen la atención los pacientes 28T, 14T y, en menor medida, el 48T. Los dos primeros son muestras clasificadas como MSI-L/MSS, pero muestran un perfil claramente similar entre ellas, y en cierta medida aproximado a la muestra 48T, clasificada como MSI-H. Por ello, representan un caso especial. Sin embargo, dicha similitud viene corroborada con la representación en el *clustergram* (Figura II) de las tres muestras, que vienen agrupadas en la misma rama, confirmando así su proximidad.

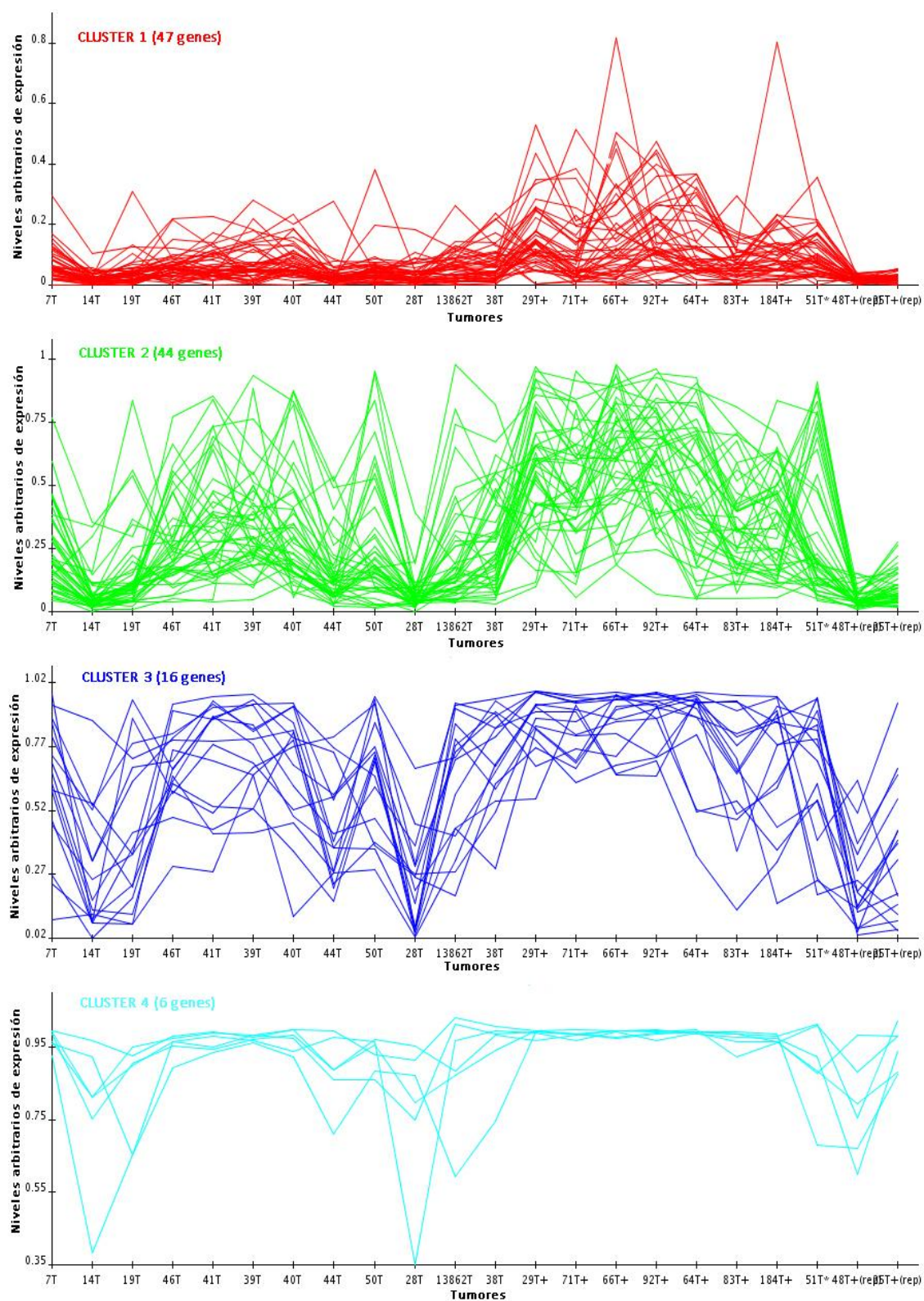


Figura III. Representación en *clusters* de los genes de la vía Wnt estudiados en las membranas de oligonucleótidos.

CLUSTER 1

CSNK1G1, CSNK1G1, CSNK2A1, CTBP1, CTBP2, CXXC4, DAAM2, DKK1, DVL2, EP300, FBXW2, FGF4, FRAT1, FSHB, FZD3, FZD4, FZD6, FZD7, FZD8, KREMEN1, LRP5, MARK4, NKD1, NLK, PORCN, SENP2, SOX17, T, TLE2, TLE3, WIF1, WISP2, WNT10B, WNT11, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A

CLUSTER 2

APC, APC2, AXIN1, AXIN2, BCL9, BTRC, CSNK1D, CSNK1G3, CSNK2A2, CSNK2B, CTNNB1, CTNNBIP1, DAAM1, DIXDC1, DKK4, FOXN1, FRAT2, FZD1, FZD10, FZD2, FZD5, FZD9, GSK3B, KREMEN2, LEF1, LRP6, NKD2, PITX2, PPP2CB, PPP2R1B, PYGO1, RHOU, SFRP1, SFRP4, SFRP5, FBXW4, TCF7, TCF7L1, TLE4, WISP1, WNT1, WNT10A, WNT5A, WNT9B

CLUSTER 3

CCND1, CSNK1A1, CSNK1G2, DKK3, DVL3, FBXW11, FOSL1, FRZB, JUN, MYC, PPP2CA, PYGO2, SLC9A3R1, TCF7L2, TLE1, WNT16

CLUSTER 4

AES, CCND2, CCND3, DVL1, GSK3A, PPP2R1A

Tabla IV. Lista de los genes incluidos en cada uno de los *clusters* o agrupaciones establecidos según su similitud de expresión, a partir del estudio de expresión de genes de la vía WNT en cánceres colorrectales con y sin inestabilidad en secuencias microsatélites.

2. 2 ANÁLISIS DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES RELACIONADOS CON LA VÍA WNT POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

2.2.1 Análisis de los datos de expresión en tumores colorrectales MSI-H y MSI-L/MSS

Una vez finalizado el estudio de expresión mediante las membranas de oligonucleótidos, se procedió a confirmar los resultados obtenidos por PCR cuantitativa a tiempo real. Esta técnica, más sensible y específica, presenta la ventaja de cuantificar el número de copias del ARNm en cuestión gracias a la presencia de sondas fluorescentes. Además, evita posibles contaminaciones por ADN genómico debido al diseño de sondas que reconocen uniones exón-exón.

Los genes seleccionados para este nuevo experimento fueron aquellos que mostraron diferencias significativas de expresión entre el grupo de tumores con inestabilidad en microsatélites y el grupo estable o con baja inestabilidad para dichas secuencias. Los candidatos surgen de la comparación entre tumores MSI-H y MSI-L/MSS con, al menos $\pm 2,5$ veces de diferencia en la expresión, y fueron: *CTNNB1*, *DVL2*, *FRAT2*, *GSK3B*, *KREMEN2*, *PPP2R1B*, *FBXW4*, *TLE2*, *WIF1*, *CSNK1D*, *CTNNBIP1*, *CXXC4*, *TLE3*.

Este grupo de genes fue estudiado en un total de 44 muestras tumorales de pacientes. De ellas, 33 fueron clasificadas como MSI-L/MSS y 11 como MSI-H. Además se incluyó en el estudio, para cada uno de los genes, un *pool* de 10 muestras no tumorales. El Ct de cada uno de los genes, que representa el número de copias, fue normalizado en todos los casos con el Ct del gen considerado como normalizador que, en nuestro caso, fue *GAPDH* ($\Delta Ct_{\text{muestra}}$). Además, cada dato de expresión de los genes problema, normalizado con *GAPDH*, fue a su vez comparado con el dato de expresión del *pool* de muestras no tumorales que, como corresponde, estaba previamente normalizado por el endógeno ($\Delta\Delta Ct$). El esquema general sería:

$$\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{gen problema muestra}} - Ct_{\text{gen normalizador muestra}}$$

$$\Delta Ct_{\text{pool no tumoral}} = Ct_{\text{gen problema pool no tumoral}} - Ct_{\text{gen normalizador pool no tumoral}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{pool no tumoral}}$$

A partir del valor de $\Delta\Delta Ct$ se obtiene el RQ ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$). Los valores de este parámetro son exponenciales, siendo la unidad la expresión que corresponde al *pool* de muestras no tumorales. Se consideró como límite diferencial $\pm 50\%$, de modo que valores menores de 0,5 del RQ implican una regulación negativa de dicho gen. Por el contrario, valores mayores de 2, significan una expresión de más del 50%.

El análisis estadístico de los resultados procedentes de la PCR cuantitativa fue llevado a cabo comprobando previamente la normalidad o no de la población. Posteriormente se compararon las medias y los correspondientes intervalos de confianza. La Tabla V resume el análisis estadístico de los genes que mostraron

RESULTADOS

diferencias significativas de expresión entre tumores MSI-H y MSI-L/MSS. Todos los tratamientos estadísticos llevados a cabo se realizaron con valores de $\Delta\Delta Ct$ o ΔCt , dado que los datos de RQ son exponenciales y, por tanto, no lineales, por lo que no son susceptibles de un tratamiento estadístico. Hay que tener en cuenta que a mayor valor de $\Delta\Delta Ct$ o de ΔCt , menor es la expresión del gen.

GEN	CLASIFICACIÓN MSI	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)			
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % PARA LA MEDIA	DIFERENCIA DE MEDIAS	P
PPP2R1B	MSI-L/MSS	1,29 (0,15)	0,97 — 1,60	0,97	0,002
	MSI-H	0,31 (0,23)	-0,20 — 0,83		
FBXW4	MSI-L/MSS	2,08 (0,15)	1,77 — 2,38	0,87	0,005
	MSI-H	1,21 (0,23)	0,70 — 1,71		
TLE3	MSI-L/MSS	1,99 (0,18)	1,63 — 2,36	0,84	0,001
	MSI-H	1,16 (0,14)	0,85 — 1,47		
DVL2	MSI-L/MSS	1,62 (0,17)	1,29 — 1,97	1,04	0,004
	MSI-H	0,58 (,31)	-0,11 — 1,27		
CSNK1D	MSI-L/MSS	1,37 (0,16)	1,04 — 1,69	0,61	0,022
	MSI-H	0,76 (0,28)	0,13 — 1,39		
WIF1*	MSI-L/MSS	11,26 (0,92)	9,39 — 13,13	4,89	0,007
	MSI-H	16,15 (1,05)	13,80 — 18,50		
KREMEN2*	MSI-L/MSS	12,22 (0,34)	11,52 — 12,92	2,50	0,004
	MSI-H	9,72 (0,93)	7,58 — 11,86		

*Datos obtenidos a partir de ΔCt

Tabla V. Análisis estadístico de los valores de expresión obtenidos para los genes de la vía WNT. Se utilizan valores de $\Delta\Delta Ct$ ó ΔCt por PCR cuantitativa a tiempo real.

El gen *PPP2R1B* corresponde a la isoforma β de la subunidad A de la fosfatasa PP2A. Como se observa en la Tabla V, el valor de $\Delta\Delta Ct$ para los tumores MSI-H es menor que en tumores MSI-L/MSS, lo que indica que estos últimos tienen una menor expresión para este gen. Si, además, observamos la diferencia de medias obtenida, ésta corresponde aproximadamente a la unidad, y dado el crecimiento exponencial en

base dos que tiene esta reacción de amplificación, cada ciclo de diferencia supone una duplicación del número de copias. El intervalo de confianza para la media no aparece acoplado, por lo que ambas poblaciones son totalmente independientes.

La estadística del gen *FBXW4* (*F-box and WD repeat domain containing 4*) muestra unos niveles mayores de expresión en los tumores con alta inestabilidad en microsatélites que en tumores con baja inestabilidad o estables. La diferencia de medias entre ambos grupos es de 0,87, también próximo a la unidad, lo que implica una diferencia de aproximadamente el doble del número de copias. Por otro lado, ambos intervalos de confianza carecen de solapamiento alguno, dato que aporta solidez a la diferencia entre ambas poblaciones.

El gen *TLE3*, *Transducin-Like Enhancer of split 3*, presenta una tendencia similar a la de *FBXW4*. Su $\Delta\Delta C_t$ menor en el grupo MSI-H en comparación a los tumores MSI-L/MSS, implica unos niveles mayores de expresión para el primer conjunto. El intervalo de confianza para la media no se acopla entre los dos tipos tumorales y la diferencia de medias es próxima a uno.

Para el caso de *DVL2* (*Dishevelled 2*) las diferencias son más notorias. Se sigue observando una mayor expresión en tumores del tipo MSI-H frente a los MSI-L/MSS y, en esta ocasión, la diferencia de medias supera la unidad. Los intervalos de confianza para la media son independientes.

Los datos de *CSNK1D*, isoforma δ de la caseína quinasa 1, son algo menos claros aun siendo significativos. La expresión es menor en tumores estables para microsatélites cotejados con los tumores MSI-H. Sin embargo, la diferencia de medias es sensiblemente menor (0,61) y los intervalos de confianza para la media aparecen solapados.

Los genes *KREMEN2* (*Kringle containing transmembrane protein 2*) y *WIF1* (*WNT inhibitory factor 1*) presentaron una falta de expresión, en ambos casos, en el *pool* de muestras no tumorales que se toma como referencia. De ahí que no se pudiese

trabajar con el dato de $\Delta\Delta Ct$, siendo necesario utilizar el valor de ΔCt . Así, el gen *KREMEN2* presenta un mayor número de copias en tumores MSI-H que en el grupo MSI-L/MSS, su diferencia de medias es apreciable y los intervalos de confianza no se solapan. WIF1, por el contrario, tiene una mayor expresión en tumores estables para microsatélites que en los inestables. Los intervalos de confianza para la media son independientes y, además, cuenta con una diferencia de medias cercana a cinco ciclos.

Estadísticamente, los diagramas de cajas ayudan a comprender la distribución de cada una de las poblaciones. En su representación, la línea gruesa del interior de la caja simboliza la mediana, siendo los extremos superior e inferior de la caja, el tercer y primer cuartil, respectivamente. Las barras suplementarias indicarían los valores máximos y mínimos de la distribución muestral. Las Figuras IV y IV bis muestran los diagramas de cajas de los genes con diferencias significativas que se han comentado en los párrafos anteriores.

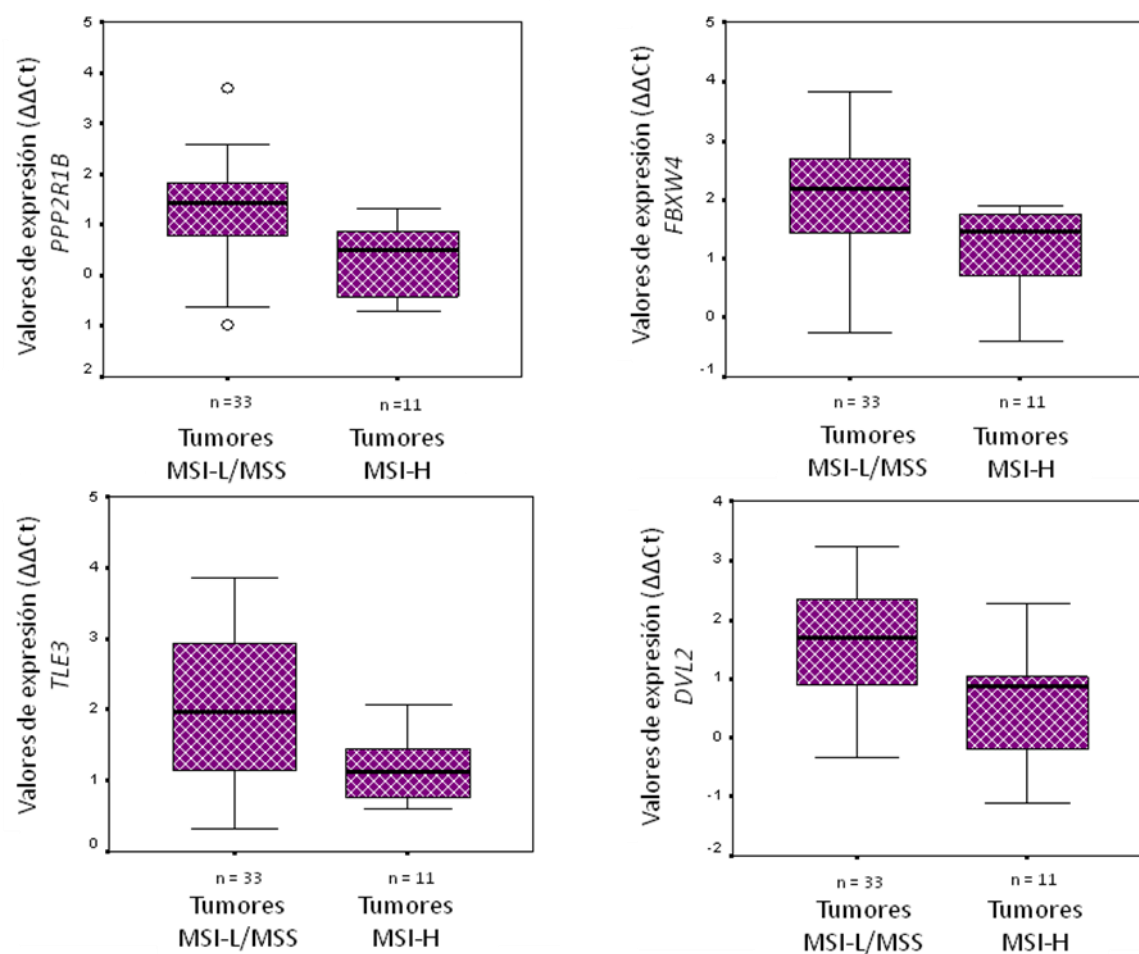


Figura IV. Representación de los diagramas de cajas para los genes que mostraron diferencias significativas de expresión entre tumores MSI-H y MSI-L/MSS, tras el estudio por PCR cuantitativa a tiempo real.

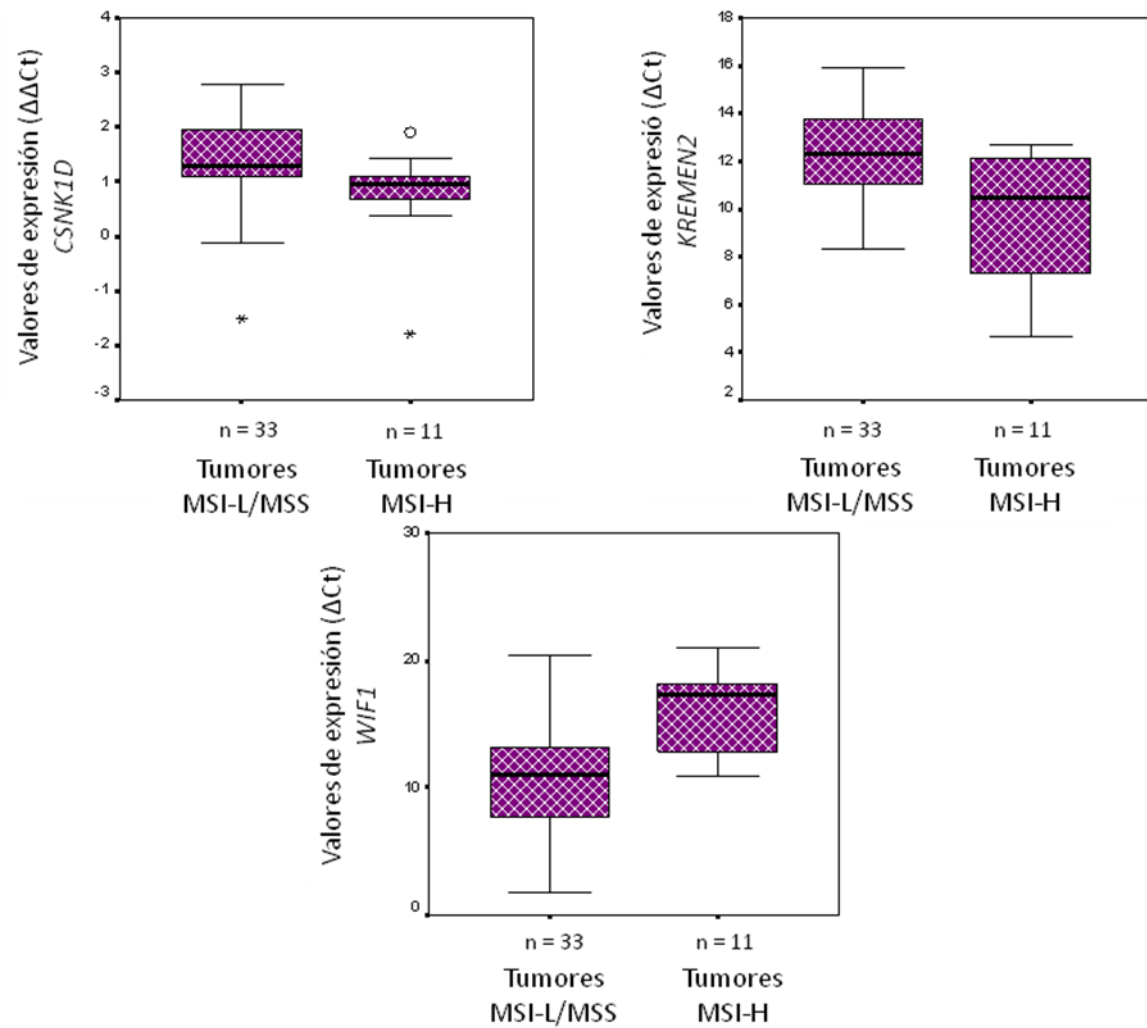


Figura IV bis. Representación de los diagramas de cajas para los genes que mostraron diferencias significativas de expresión entre tumores MSI-H y MSI-L/MSS tras el estudio por PCR cuantitativa a tiempo real.

Los datos de $\Delta\Delta Ct$ también pueden reflejarse en forma de RQ. Sabemos que valores de RQ comprendidos entre 0,5 y 2 reflejan niveles de ARNm normales (comparados con el *pool* de muestras no tumorales). De este modo, la imagen de la Figura V reproduce los RQ de los genes con variaciones significativas de expresión en forma de diagrama de barras. Para los genes *KREMEN2* y *WIF1* sólo se dispuso del dato de ΔCt , por lo que no se pudo obtener el correspondiente RQ. La Figura V deja patente que las muestras MSI-H tienen niveles de expresión comprendidos en los límites de la normalidad, mientras que las muestras MSI-L/MSS tienden a presentar niveles de

expresión menores del 50 % con respecto a los niveles considerados como normales (valor de RQ = 1, es decir, el valor RQ detectado en el *pool* de muestras no tumorales).

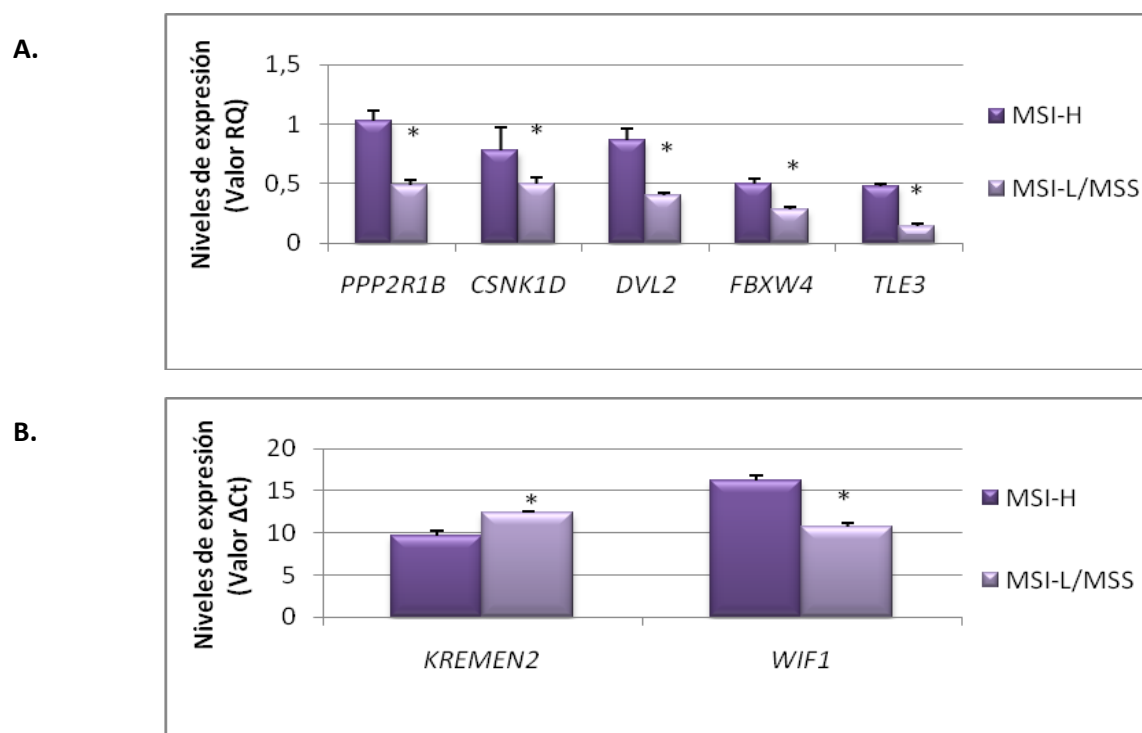


Figura V. (A) Representación de los valores de RQ de los genes de la vía WNT con diferencias significativas de expresión tras el estudio por PCR cuantitativa a tiempo real. **(B)** *KREMEN2* y *WIF1* no disponen de datos de expresión en las muestras normales, por ello su gráfica corresponde a valores de ΔCt , Ct del gen problema normalizado con el correspondiente gen endógeno.

2.2.2 Análisis de los datos de expresión con relación a las características clínicas de los tumores MSI-L/MSS

En este apartado se consideraron los datos clínicos disponibles para los tumores MSI-L/MSS. En relación a esta población, se analizaron las posibles diferencias significativas de expresión ($\Delta\Delta Ct$ ó ΔCt según el caso) de los genes previamente seleccionados (*PPP2R1B*, *DVL2*, *KREMEN2*, *WIF1*, *CSNK1D*, *TLE3* y *FBXW4*), en relación a las siguientes características clínicopatológicas: estadio de Dukes (A, B, C y D), grado de infiltración ganglionar (N0, N1 y N2), localización tumoral (colon derecho, izquierdo

o recto), tamaño del tumor (T1, T2, T3 y T4), recidiva (sí, no) y metástasis a distancia (M0, M1). El estudio se llevó a cabo mediante la prueba de ANOVA para aquellas poblaciones que resultaron normales. El estadístico *Kruskal-Wallis* se empleó como alternativa no paramétrica. Para la variable clínica tamaño del tumor, se optó por agrupar los tumores con tamaño T4 dentro del grupo T3, dado que solo existía un solo caso con T4. Por otro lado, no se dio ningún caso con T1. Con esto, el análisis se realizó comparando los tumores T2 y T3 (incluido el caso T4). Así, en el caso de las variables tamaño del tumor reagrupado, recidiva y metástasis a distancia, se empleó la *T-student* o la U de *Mann-Withney* según la normalidad de la población.

No se encontraron diferencias significativas para el estudio de relación de expresión de los genes en cuanto al estadio de Dukes (Tabla VI). En cuanto a la variable de infiltración ganglionar, la Tabla VII muestra el análisis realizado con los grupos N0, N1 y N2 sin resultados significativos. No obstante, el grupo N2 solo contaba con tres casos, por lo que se realizó el análisis de expresión frente al grado de infiltración ganglionar reagrupando N2 en los casos N1. Esta reorganización tampoco arrojó resultados significativos. En cuanto al análisis en relación al tamaño tumoral (Tabla IX), se obtuvieron resultados próximos a la significatividad para el gen *DVL2* ($P = 0,056$) y significativos para el gen *TLE3* ($P = 0,027$). Si bien es cierto, los intervalos de confianza al 95 % aparecen solapados en ambos casos. Los estudios realizados en función de la localización tumoral, recidiva y metástasis, tampoco mostraron resultados significativos (Tablas VIII, X, XI).

También se procedió al análisis individual de cada gen respecto a cada uno de los subgrupos considerados con respecto a las diferentes variables clínicas, sin resultados significativos, excepto para el gen *KREMEN2* y la localización tumoral. Se obtuvo una media de ΔCt de 13,72 para tumores localizados en colon izquierdo, con un error estándar para la media de 0,54; y para tumores localizados en recto la media fue de 11,73 y el error estándar para la media 0,51. Los intervalos de confianza para la media (95 %) fueron (12,33 — 15,11) para la localización izquierda y (10,61 — 12,84) para localización en recto ($P = 0,030$). Los intervalos de confianza se solapan ligeramente, pero existe una diferencia de medias de 1,99 ciclos.

GEN	ESTADIO DE DUKES	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)		
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	P
CSNK1D	A	1,54 (0,29)	0,61 — 2,48	0,893
	B	1,22 (0,32)	0,51—1,92	
	C	1,49 (0,25)	0,90 — 2,08	
	D	1,40 (0,31)	0,68 — 2,13	
DVL2	A	1,99 (0,17)	1,46 — 2,53	0,494
	B	1,84 (0,34)	1,11 — 2,56	
	C	1,25 (0,31)	0,50 — 1,99	
	D	1,46 (0,28)	0,80 — 2,13	
FBXW4	A	2,29 (0,36)	1,15 — 3,43	0,912
	B	1,95 (0,26)	1,39 — 2,51	
	C	2,15 (0,27)	1,51 — 2,79	
	D	2,10 (0,36)	1,24 — 2,96	
KREMEN2*	A	11,21 (0,89)	8,39 — 14,04	0,625
	B	12,17 (0,33)	11,46; 12,88	
	C	12,19 (0,94)	9,97 — 14,42	
	D	12,84 (0,86)	10,81 — 14,87	
PPP2R1B	A	1,44 (0,30)	0,49 — 2,40	0,987
	B	1,28 (0,29)	0,65 — 1,91	
	C	1,25 (0,27)	0,96 — 1,90	
	D	1,26 (0,34)	0,44 — 2,07	
TLE3	A	1,46 (0,22)	0,76 — 2,16	0,585
	B	1,90 (0,30)	1,24 — 2,55	
	C	2,13 (0,30)	1,42 — 2,84	
	D	2,30 (0,45)	1,22 — 3,37	
WIF1*	A	13,03 (2,88)	3,85 — 22,20	0,517
	B	11,48 (1,46)	8,29 — 14,66	
	C	8,93 (1,82)	4,62 — 13,25	
	D	12,37 (1,91)	7,85 — 16,88	

*Datos obtenidos a partir de ΔCt

Tabla VI. Relación entre los niveles de expresión génica y estadio de Duke en tumores colorrectales MSI-L/MSS.

GEN	GRADO DE INFLITRACIÓN GANGLIONAR	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)		
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	P (N0, N1)
CSNK1D	N0	1,22 (0,24)	0,71 — 1,72	0,380
	N1	1,62 (0,24)	1,06 — 2,18	
	N2	1,88 (0,30)	0,58 — 3,17	
DVL2	N0	1,82 (0,25)	1,30 — 2,34	0,503
	N1	1,34 (0,28)	0,70 — 1,98	
	N2	1,52 (0,54)	-0,82 — 3,87	
FBXW4	N0	1,97 (0,21)	1,53 — 2,41	0,536
	N1	2,21(0,30)	1,52 — 2,91	
	N2	2,53 (0,38)	0,87 — 4,19	
KREMEN2*	N0	11,33 (0,33)	11,14 — 12,53	0,469
	N1	12,77 (0,82)	10,89 — 14,65	
	N2	12,72 (2,19)	3,30 — 22,13	
PPP2R1B	N0	1,24 (0,23)	0,76 — 1,73	0,616
	N1	1,41 (0,23)	0,88 — 1,95	
	N2	1,51 (0,63)	-0,18 — 4,21	
TLE3	N0	1,84 (0,25)	1,31 — 2,36	0,119
	N1	2,02 (0,29)	1,34 — 2,70	
	N2	3,17 (0,29)	1,94 — 4,40	
WIF1*	N0	11,48 (1,16)	9,04 — 13,92	0,792
	N1	11,06 (1,94)	6,57 — 15,54	
	N2	9,27 (2,18)	-0,13 — 18,66	

*Datos obtenidos a partir de ΔCt

Tabla VII. Estudio de la expresión génica y el grado de invasión ganglionar en cánceres colorrectales MSI-L/MSS. Solo los grupos N0 y N1 fueron considerados para el valor de P, dado que N2 tenía un tamaño muestral muy pequeño.

GEN	LOCALIZACIÓN	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)		
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	P
<i>CSNK1D</i>	Colon derecho	1,28 (0,37)	0,44 — 2,12	0,839
	Colon izquierdo	1,53 (0,42)	0,44 — 2,63	
	Recto	1,25 (0,22)	0,77 — 1,73	
<i>DVL2</i>	Colon derecho	1,86 (0,32)	1,13 — 2,58	0,244
	Colon izquierdo	1,80 (0,49)	0,53 — 3,08	
	Recto	1,23 (0,21)	0,78 — 1,68	
<i>FBXW4</i>	Colon derecho	2,02(0,33)	1,28 — 2,76	0,985
	Colon izquierdo	2,03 (0,41)	0,98 — 3,07	
	Recto	2,08 (0,23)	1,58 — 2,59	
<i>KREMEN2*</i>	Colon derecho	12,67 (0,94)	11,21 — 14,12	0,099
	Colon izquierdo	13,72 (0,54)	12,33 — 15,11	
	Recto	11,73 (0,51)	10,61 — 12,84	
<i>PPP2R1B</i>	Colon derecho	1,62 (0,31)	0,92 — 2,32	0,571
	Colon izquierdo	1,28 (0,39)	0,28 — 2,27	
	Recto	1,04 (2,24)	0,52 — 1,57	
<i>TLE3</i>	Colon derecho	1,17 (0,38)	1,30 — 3,05	0,670
	Colon izquierdo	1,69 (3,07)	0,73 — 2,65	
	Recto	1,91 (0,28)	1,31 — 2,52	
<i>WIF1*</i>	Colon derecho	12,91 (1,97)	8,45 — 17,38	0,596
	Colon izquierdo	10,19 (1,01)	7,60 — 12,79	
	Recto	11,44 (1,47)	8,23 — 14,64	

*Datos obtenidos a partir de ΔCt

Tabla VIII. Relación entre la localización tumoral y el nivel de expresión génica en tumores colorrectales sin alta inestabilidad.

GEN	TAMAÑO DEL TUMOR REAGRUPADO	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)		
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	P
CSNK1D	T2	1,69 (0,27)	0,94 — 2,43	0,428
	T3	1,32 (0,19)	0,94 — 1,71	
DVL2	T2	2,08 (0,16)	1,64 — 2,53	0,056
	T3	1,56 (0,20)	1,15 — 1,98	
FBXW4	T2	2,37 (0,29)	1,57 — 3,18	0,415
	T3	2,02 (0,17)	1,66 — 2,38	
KREMEN2*	T2	11,25 (0,69)	9,34 — 13,16	0,230
	T3	12,43 (0,39)	11,62 — 13,24	
PPP2R1B	T2	1,44 (0,23)	0,79 — 2,09	0,719
	T3	1,28 (0,18)	0,90 — 1,66	
TLE3	T2	1,44 (0,17)	0,97 — 1,92	0,027
	T3	2,09 (0,21)	1,66 — 2,52	
WIF1*	T2	10,77 (3,17)	1,96 — 19,58	0,765
	T3	11,56 (0,97)	9,57 — 13,54	

*Datos obtenidos a partir de ΔCt

Tabla IX. Análisis entre el tamaño del tumor y los niveles de expresión génica en cánceres colorrectales con baja o nula inestabilidad en microsatélites.

GEN	RECIDIVA	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)		
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	P
CSNK1D	No	1,32(0,23)	0,83 — 1,81	0,881
	Sí	1,41 (0,16)	0,91 — 1,91	
DVL2	No	1,64 (0,20)	1,21 — 2,06	0,878
	Sí	1,55 (0,58)	-0,31 — 3,42	
FBXW4	No	2,09 (0,22)	1,62 — 2,56	0,965
	Sí	2,11 (0,28)	1,21 — 3,01	
KREMEN2*	No	11,95 (0,42)	11,08 — 12,83	0,479
	Sí	12,67 (0,56)	10,90 — 14,4	
PPP2R1B	No	1,36 (0,22)	0,90 — 1,82	0,797
	Sí	1,22 (0,28)	0,32 — 2,13	
TLE3	No	2,04 (0,25)	1,52 — 2,57	0,837
	Sí	1,92 (0,45)	0,47 — 3,3	
WIF1*	No	12,88 (0,98)	10,84 — 14,92	0,882
	Sí	11,63 (3,57)	0,26 — 23,01	

*Datos obtenidos a partir de ΔCt

Tabla X. Resultados del estudio entre los niveles de expresión génica y la recidiva tumoral en cánceres colorrectales MSI-L/MSS.

GEN	METÁSTASIS A DISTANCIA	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)		
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	P
<i>CSNK1D</i>	M0	1,65 (0,18)	1,26 — 2,04	0,466
	M1	1,40 (0,31)	0,91 — 1,91	
<i>DVL2</i>	M0	1,97 (0,25)	1,43 — 2,51	0,203
	M1	1,46 (0,28)	0,80 — 2,13	
<i>FBXW4</i>	M0	2,31 (0,21)	1,84 — 2,77	0,607
	M1	2,10 (0,36)	1,24 — 2,96	
<i>KREMEN2*</i>	M0	11,99 (0,54)	11,82 — 13,17	0,389
	M1	12,84 (0,86)	10,81 — 14,87	
<i>PPP2R1B</i>	M0	1,46 (0,13)	1,17 — 1,74	0,528
	M1	1,26 (0,34)	0,44 — 2,07	
<i>TLE3</i>	M0	1,87 (0,24)	1,34 — 2,39	0,371
	M1	2,30 (0,45)	1,22 — 3,37	
<i>WIF1*</i>	M0	11,53 (1,35)	8,58 — 14,47	0,716
	M1	12,37 (1,91)	7,85 — 16,88	

*Datos obtenidos a partir de ΔCt

Tabla XI. Relación entre los niveles de expresión génica y la presencia de metástasis a distancia en tumores con baja inestabilidad o estables para microsatélites.

Asímismo, se llevó a cabo un análisis de supervivencia, considerando el intervalo libre de enfermedad en la población de tumores estables o con baja inestabilidad para microsatélites, seleccionando los casos clasificados comprendidos entre los estadios Dukes A - C y que no hubiesen fallecido en el periodo del postoperatorio. Los datos de expresión génica fueron categorizados en función del percentil 50. Para ninguno de los genes que se vienen estudiando se encontraron diferencias significativas en relación a la supervivencia de los pacientes. En el caso de *CSNK1D*, los pacientes con menor expresión del gen recidivan en un 11.1 %, mientras que aquellos con mayor expresión recidivan en un 30% de los casos ($P = 0,402$). La misma situación muestran los pacientes para los genes *PPP2R1B* ($P = 0,443$) y *TLE-3* ($P = 0,402$). En el caso de los genes *FBXW4*, *KREMEN2* y *WIF1*, pacientes con mayor

expresión de dichos genes, recidivan en un 11,1 %, mientras que aquellos con menor expresión, lo hacen en un 30% de los casos, con unos valores de P de 0,402; 0,299 y 0,372, respectivamente. Para el gen *DVL-2*, el 33,3 % de los casos con expresión alta del gen recidivaron. En cambio, únicamente se detectaron recidivas en el 10 % de los pacientes con expresión baja ($P = 0,275$).

3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON ADHESIÓN CELULAR Y MATRIZ EXTRACELULAR

3.1 ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN ADHESIÓN Y MATRIZ EXTRACELULAR CON MATRICES DE OLIGONUCLEÓTIDOS

El estudio se llevó a cabo con el ARN de 17 tumores clasificados según su fenotipo MSI. Concretamente, 9 casos fueron clasificados en el grupo de alta inestabilidad (MSI-H) y 8 tumores resultaron pertenecer al grupo de baja inestabilidad o estables para microsatélites (MSI-L/MSS). Además, se dispuso de un *pool* de 10 muestras no tumorales. El ARN, según el protocolo de la casa comercial, fue previamente marcado y transformado a ARNc, siendo este producto final el que se hibridó con los oligonucleótidos fijados en las membranas. El conjunto de genes analizados se muestra en la Tabla XII.

RESULTADOS

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	RPS27A	ADAMTS1	ADAMTS13	ADAMTS8	CD44	CDH1	CNTN1	COL11A1
2	COL11A2	COL12A1	COL14A1	COL15A1	COL16A1	COL18A1	COL19A1	COL1A1
3	COL24A1	COL27A1	COL4A2	COL4A3	COL4A6	COL5A1	COL5A3	COL6A1
4	COL6A2	COL6A3	COL7A1	COL8A1	COL8A2	COL9A1	VCAN	CTGF
5	CTNNA1	CTNNB1	CTNND1	CTNND2	ECM1	FN1	HAS1	ICAM1
6	ITGA1	ITGA10	ITGA11	ITGA2	ITGA2B	ITGA3	ITGA4	ITGA5
7	ITGA6	ITGA7	ITGA8	ITGA9	ITGAL	ITGAM	ITGAV	ITGAX
8	ITGB1	ITGB2	ITGB3	ITGB4	ITGB5	ITGB6	ITGB7	ITGB8
9	KAL1	LAMA1	LAMA2	LAMA3	LAMA4	LAMA5	LAMB1	LAMB2
10	LAMB3	LAMB4	LAMC1	MMP-1	MMP-10	MMP-11	MMP-12	MMP-13
11	MMP-14	MMP-15	MMP-16	MMP-17	MMP-2	MMP-20	MMP-24	MMP-26
12	MMP-3	MMP-7	MMP-8	MMP-9	NCAM1	PECAM1	SELE	SELL
13	SELP	SGCE	SPARC	SPG7	SPOCK1	SPP1	TGFBI	THBS1
14	THBS2	THBS3	THBS4	TIMP1	TIMP2	TIMP3	CLEC3B	TNC
15	VCAM1	VTN	PUC18	Blanco	Blanco	AS1R2	AS1R1	AS1
16	GAPDH	B2M	HSP90AB1	HSP90AB1	ACTB	ACTB	BAS2C	BAS2C

Tabla XII. Esquema de los genes de adhesión y matriz extracelular analizados en las membranas de oligonucleótidos. Las celdas rayadas corresponden a los blancos. En negrita aparecen señalados los genes susceptibles de ser empleados como normalizadores. En nuestro caso se empleó *GAPDH*.

La detección del grado de hibridación se llevó a cabo por quimioluminiscencia y los resultados fueron escaneados y analizados con el programa informático *GEArray Expression Analysis Suite 2.0*, que dispone *online* la casa comercial *Superarray*. Para el análisis se eligió de nuevo *GAPDH* como gen normalizador. A continuación, se llevó a cabo una comparación de expresión entre tumores MSI-H y MSI-L/MSS. Así, se definió el *scatterplot* de la Figura VI considerando como punto de corte ± 2 veces de diferencia de expresión entre ambos grupos. La referencia de dichos genes, así como el número de veces de expresión diferencial, la media y su error estándar, y la significación estadística, quedan recogidos en la Tabla XIII.

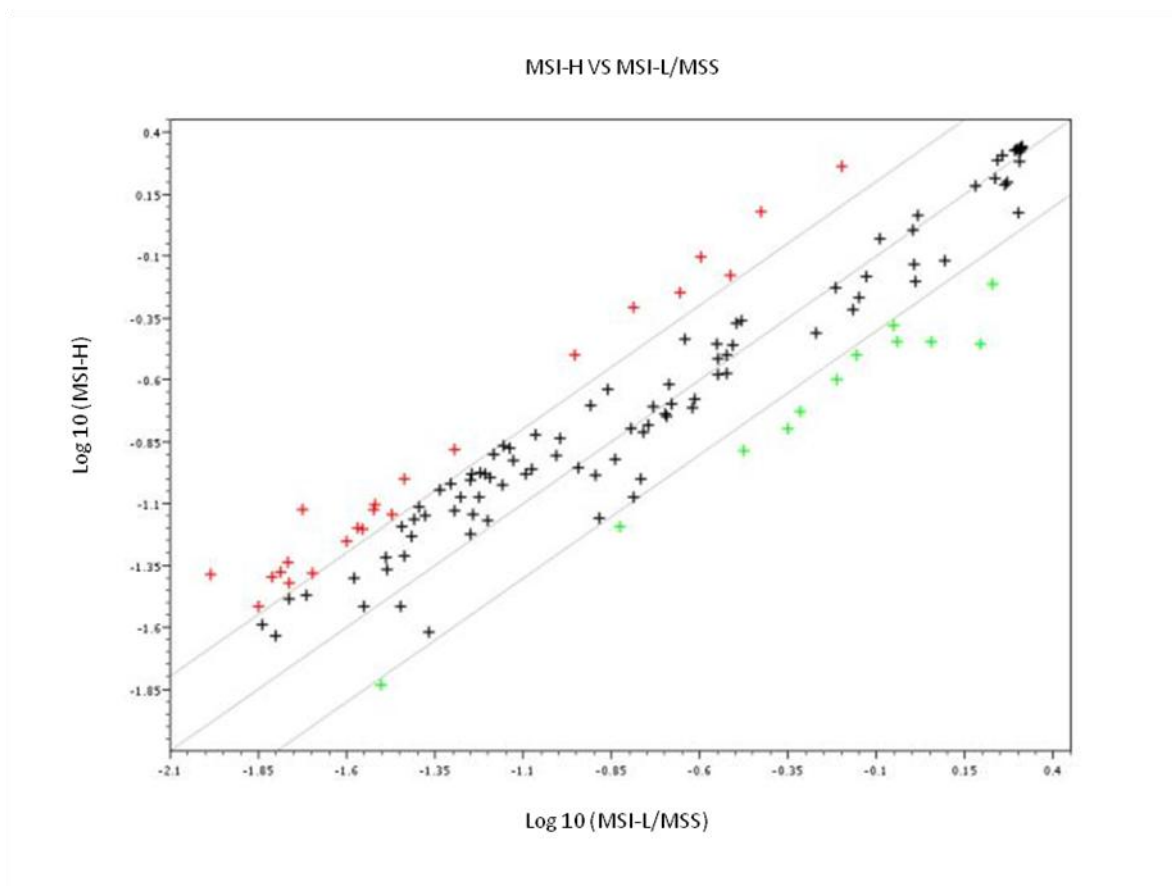


Figura VI. *Scatterplot* de tumores MSI-H en comparación con tumores MSI-L/MSS con un límite de ± 2 veces.

RESULTADOS

Gen	Diferencias de expresión MSI-H vs MSI-L/MSS (Nº de veces)	Valor P	Gen	Diferencias de expresión MSI-H vs MSI-L/MSS (Nº de veces)	Valor P
<i>ADAMTS8</i>	2,20	0,575	<i>LAMA5</i>	2,16	0,500
<i>COL11A1</i>	2,16	0,656	<i>LAMB3</i>	2,59	0,297
<i>COL1A1</i>	2,74	0,883	<i>LAMB4</i>	2,70	0,138
<i>COL4A3</i>	2,07	0,621	<i>LAMC1</i>	2,58	0,558
<i>COL5A1</i>	2,25	0,257	<i>MMP-15</i>	2,85	0,044
<i>ICAM1</i>	2,57	0,136	<i>ADAMTS13</i>	0,47	0,169
<i>ITGA10</i>	2,58	0,214	<i>COL12A1</i>	0,45	0,036
<i>ITGA2</i>	3,98	0,090	<i>CSPG2</i>	0,39	0,034
<i>ITGA2B</i>	2,60	0,590	<i>FN1</i>	0,36	0,038
<i>ITGA3</i>	3,19	0,018	<i>LAMA4</i>	0,40	0,083
<i>ITGA8</i>	2,22	0,181	<i>MMP-3</i>	0,47	0,336
<i>ITGA9</i>	3,99	0,014	<i>MMP-7</i>	0,22	0,054
<i>ITGAL</i>	3,04	0,067	<i>SGCE</i>	0,39	0,059
<i>ITGAV</i>	2,12	0,689	<i>SPP1</i>	0,31	0,067
<i>ITGB3</i>	2,51	0,097	<i>THBS3</i>	0,43	0,245
<i>ITGB4</i>	2,87	0,003	<i>THBS4</i>	0,36	0,162
<i>ITGB7</i>	3,10	0,016	<i>VCAM1</i>	0,41	0,229
<i>LAMA2</i>	2,35	0,275			

Tabla XIII. Descripción de los genes relacionados con adhesión y matriz extracelular que mostraron diferencias de expresión en el *scatterplot* de cánceres colorrectales MSI-H frente a MSI-L/MSS.

El análisis de expresión diferencial entre los dos grupos también quedó reflejado en el *clustergram* de los tumores objeto de estudio (Figura VII). Esta Figura muestra la agrupación de las distancias en cuanto a expresión entre las muestras y los diferentes genes. Al contrario que en el caso de las membranas de oligonucleótidos para la vía WNT, no se encuentra diferenciación de dos poblaciones. En cambio, sí se observan las mismas tendencias para ciertos genes en todas las muestras.

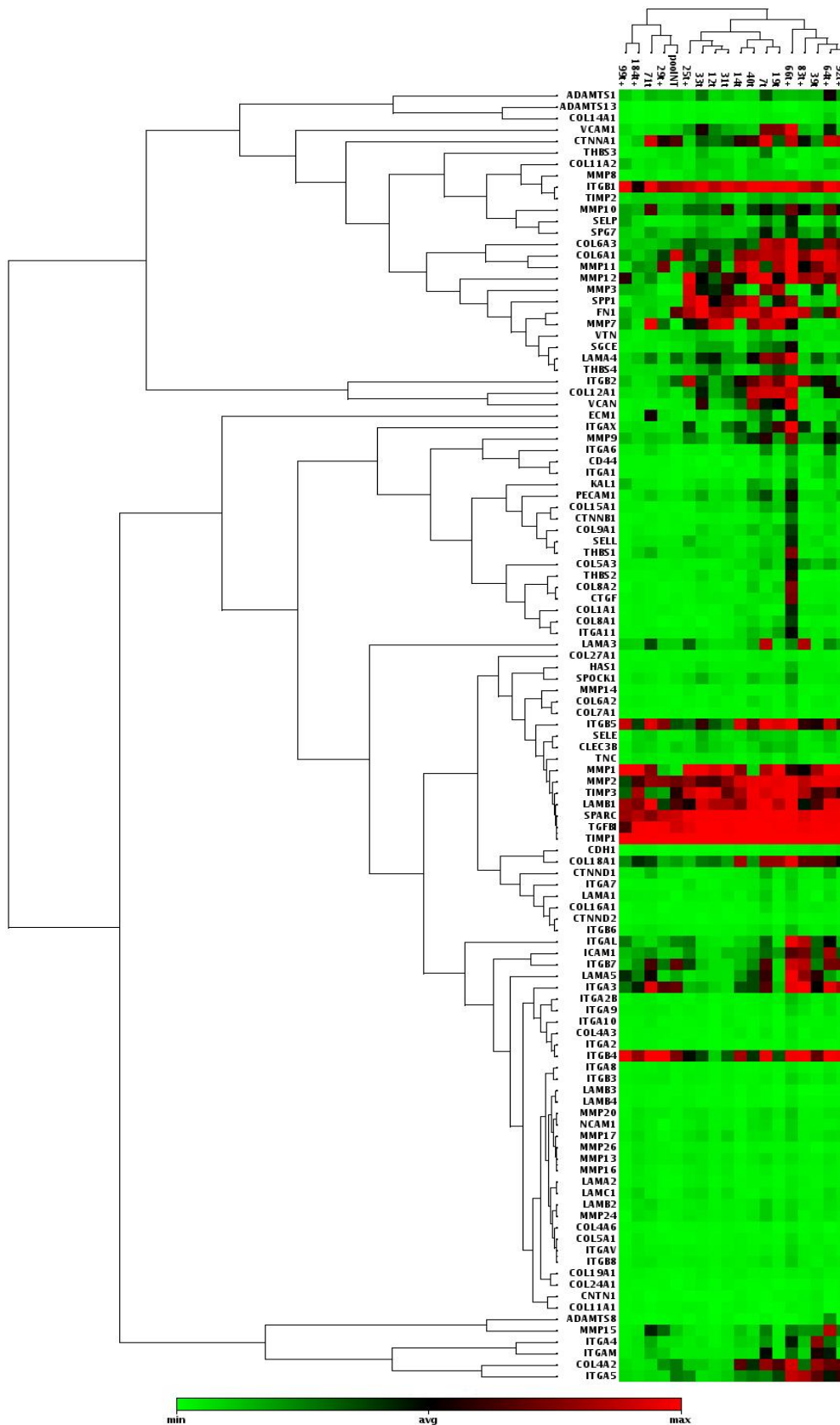


Figura VII. Clustergram de las matrices de adhesión celular y matriz extracelular. El código de color indica las diferencias de expresión del gen en las diferentes muestras.

RESULTADOS

Por otro lado, se realizó la agrupación de genes en *clusters* (Figura VIII). Los genes aparecen agrupados en función de su proximidad en cuanto a niveles de expresión. Es destacable la homogeneidad que presentan todas las agrupaciones. De hecho, la mayoría de los genes quedan agrupados en un mismo bloque. La Tabla XIV recoge los genes pertenecientes a los diferentes *clusters*.

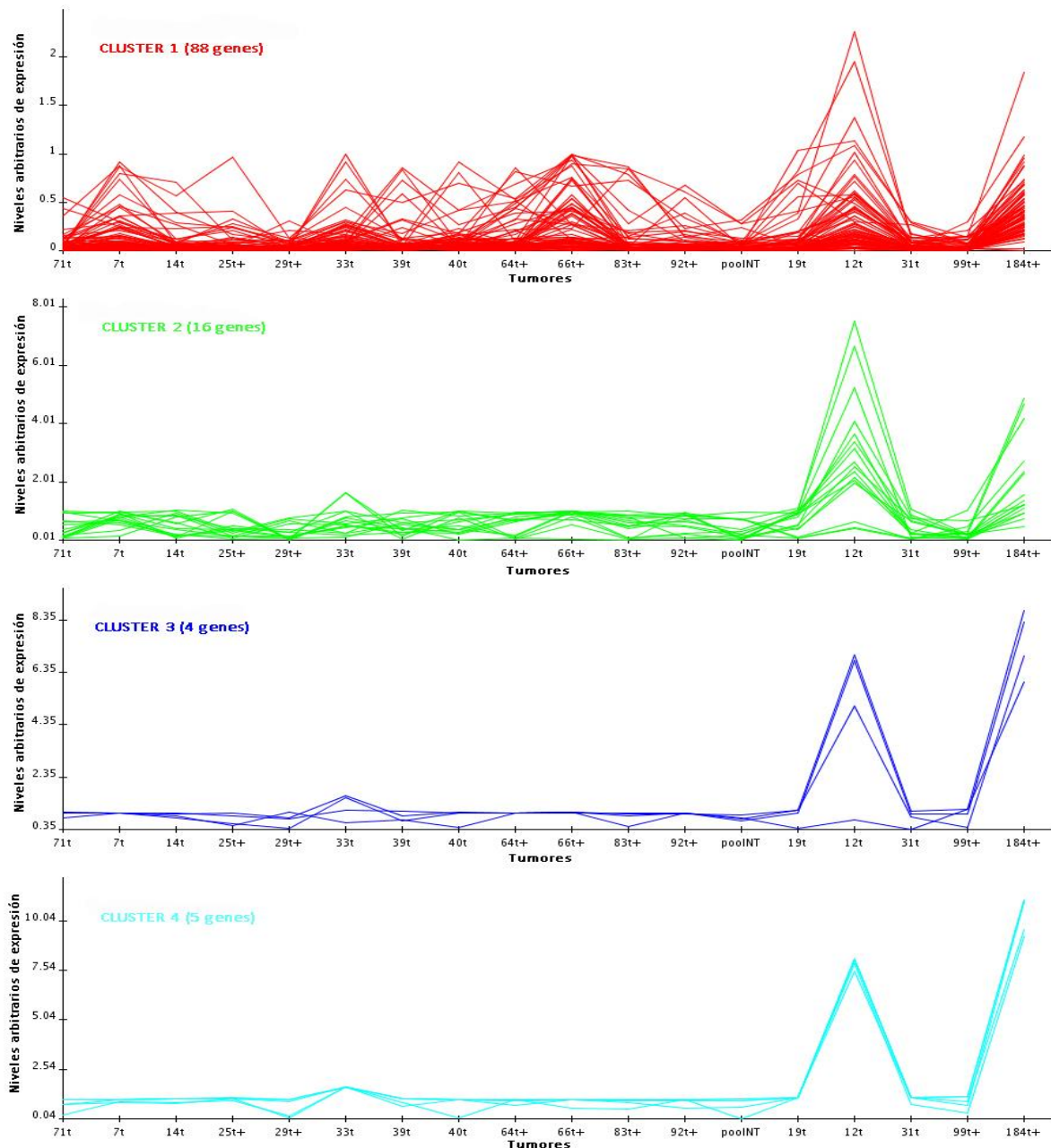


Figura VIII. Agrupación en *clusters* de los genes codificantes para moléculas de adhesión celular y matriz extracelular estudiados en las matrices.

CLUSTER 1

ADAMTS1, ADAMTS13, ADAMTS8, CD44, CDH1, CNTN1, COL11A1, COL11A2, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL19A1, COL1A1, COL24A1, COL27A1, COL4A2, COL4A3, COL4A6, COL5A1, COL5A3, COL6A2, COL7A1, COL8A1, COL8A2COL9Z1, VCAN, CTGF, CTNNB1, CTNND1, CTNND2, ECM1, HAS1, ICAM1, ITGA1, ITGA10, ITGA10, ITGA11, ITGA2, ITGA2B, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGA9, ITGAL, ITGAM, ITGAV, ITGAX, ITGB2, ITGB3, ITGB6, ITGB8, KAL1, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMB2, LAMB3, LAMB4, LAMC1, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-20, MMP-24, MMP-6, MMP-8, MMP-9, NCAM1, PECAM1, SELE, SELL, SELP, SGCE, SPG7, SPOCK1, THBS1, THBS2, THBS3, THBS4, TIMP2, CLEC3B, TNC, VCAN1, VTN

CLUSTER 2

COL18A1, COL6A1, COL6A3, CTNNA1, FN1, ITGA3, ITGB5, ITGB7, LAMA4, LAMA5, MMP10, MMP-11, MMP-12, MMP-3, MMP-7, SPP1

CLUSTER 3

ITGB1, ITGB4, LAMB1, MMP-2

CLUSTER 4

MMP-1, SPARC, TGFBI, TIMP1, TIMP3

Tabla XIV. Detalle de los genes de adhesión celular y matriz extracelular pertenecientes a los distintos *clusters* establecidos a partir del estudio de expresión en membranas.

3.2 ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN ADHESIÓN Y MATRIZ EXTRACELULAR POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

3.2.1 Análisis de los datos de expresión de los genes de adhesión y matriz extracelular en tumores MSI-H y MSI-L/MSS

Tras el estudio con membranas de oligonucleótidos, se seleccionaron aquellos genes que, una vez establecido el punto de corte de ± 2 veces de diferencia de expresión entre tumores MSI-H y MSI-L/MSS, mostraron diferencias significativas. Por tanto, los genes seleccionados para el estudio fueron: *ITGA3, ITGA9, ITGB4, ITGB7, MMP-15, COL12A1, CSPG2, FN1, MMP-7* y *SGCE*.

RESULTADOS

Para esta técnica se contó con 11 muestras de ARNm de tumores MSI-H y 31 muestras MSI-L/MSS. El gen normalizador fue *GAPDH* y se utilizó de nuevo el *pool* de 10 muestras no tumorales. Gracias a los datos proporcionados por este conjunto de muestras no tumorales, se pudieron referenciar los niveles de expresión que consideramos como normales. El tratamiento de datos que se proporcionó a este experimento fue descrito en el apartado 2 de resultados. Así, se trabajó con valores de $\Delta\Delta Ct$ ó RQ según el caso ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$). Tras el correspondiente tratamiento estadístico, los resultados indicaron que dos de los genes analizados presentaban diferencias significativas en los grupos de cáncer colorrectal investigados: *SGCE* y *MMP-7*. La Tabla XV muestra las diferencias encontradas.

GEN	CLASIFICACIÓN MSI	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)			
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	DIFERENCIA DE MEDIAS	P
<i>SGCE</i>	MSI-L/MSS	1,25 (0,19)	0,36 — 1,64	2,30	0,001
	MSI-H	3,55 (0,53)	2,36 — 4,74		
<i>MMP-7</i>	MSI-L/MSS	-6,80 (0,31)	-7,45 — -6,16	1,84	0,009
	MSI-H	-4,97 (0,70)	-6,52 — -3,41		

Tabla XV. Diferencias de expresión para los genes *SGCE* y *MMP-7* en tumores colorrectales con y sin inestabilidad en microsatélites. Se aprecian las altas diferencias de medias y la fuerza que conceden los intervalos de confianza al 95% para la media.

El gen *SGCE*, *Sarcoglycan-Epsilon*, muestra menores niveles de expresión en el grupo de tumores con alta inestabilidad en microsatélites en comparación con el grupo de tumores sin alta inestabilidad. Estas diferencias son significativas ($P = 0,001$) y los intervalos de confianza no aparecen solapados. La diferencia de medias es además considerable, teniendo en cuenta que cada incremento en una unidad implica el doble del número de copias.

La metaloproteasa *MMP-7*, *Matrix Metalloproteinase 7*, presentó niveles de expresión elevados para ambos grupos, de ahí los valores negativos de $\Delta\Delta Ct$. Dichos valores implican ΔCt s para el *pool* de muestras no tumorales más altos que los de las muestras tumorales, es decir, menor expresión. Sin embargo, entre los dos tipos de tumores, los MSI-L/MSS son los que presentaron una mayor expresión de esta metaloproteasa. A pesar de que se detecta un ligero solapamiento de los intervalos de confianza para la media, las diferencias entre los dos grupos son significativas, y la diferencia de medias es mayor que la unidad.

La Figura IX muestra el diagrama de cajas para los genes *SGCE* y *MMP-7* que mostraron diferencias significativas tras el estudio de expresión por PCR cuantitativa a tiempo real en los dos tipos de tumores colorrectales considerados.

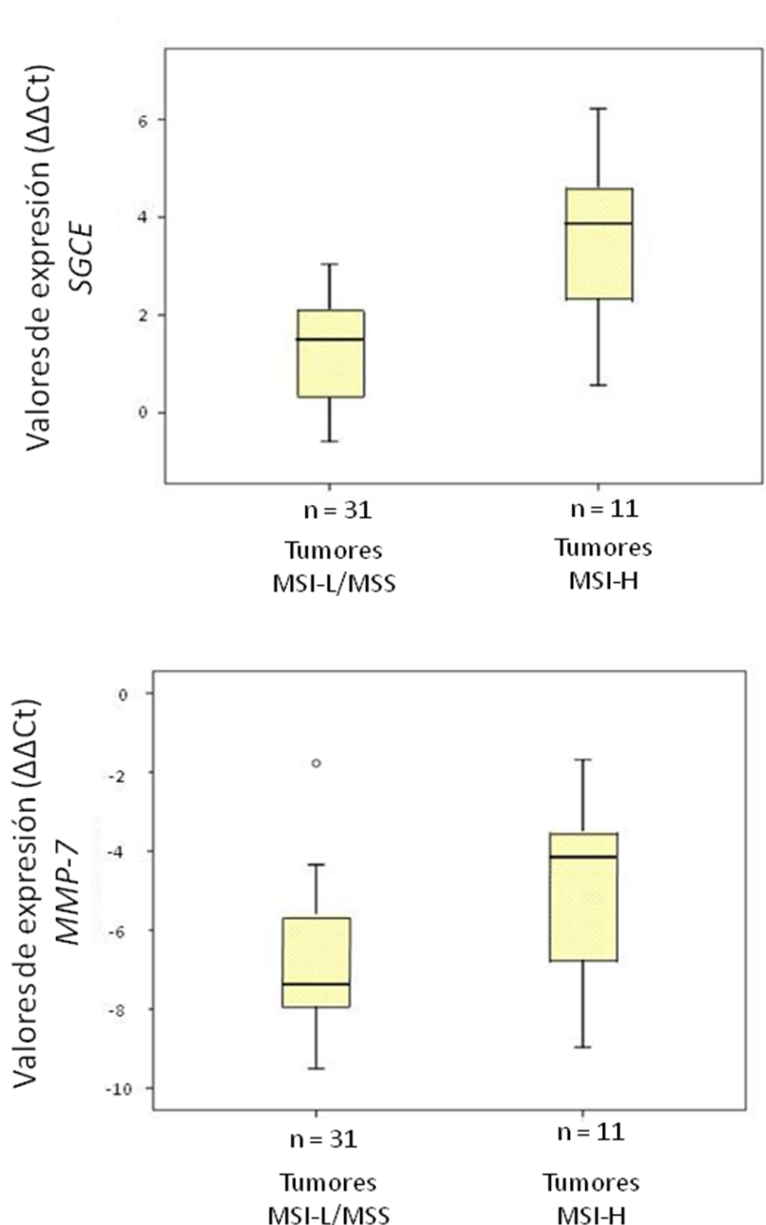


Figura IX. Diagrama de cajas para *MMP-7* y *SGCE*, tras su estudio por PCR cuantitativa a tiempo real. El círculo representa un valor extremo.

La Figura X representa un diagrama con los valores de RQ para los dos genes con diferencias significativas. Se observa que *MMP-7*, como habíamos señalado ya con los valores de $\Delta\Delta C_t$, se sobreexpresa en ambos tipos tumorales, pero el RQ es mucho mayor en el caso de tumores colorrectales MSI-L/MSS, de ahí su mayor expresión. Para el gen *SGCE*, los valores de RQ refieren a unos valores de expresión normales para tumores estables en microsatélites, por estar su RQ comprendido entre 0,5 y 2. En cambio los tumores MSI-H parecen perder expresión, en este caso.

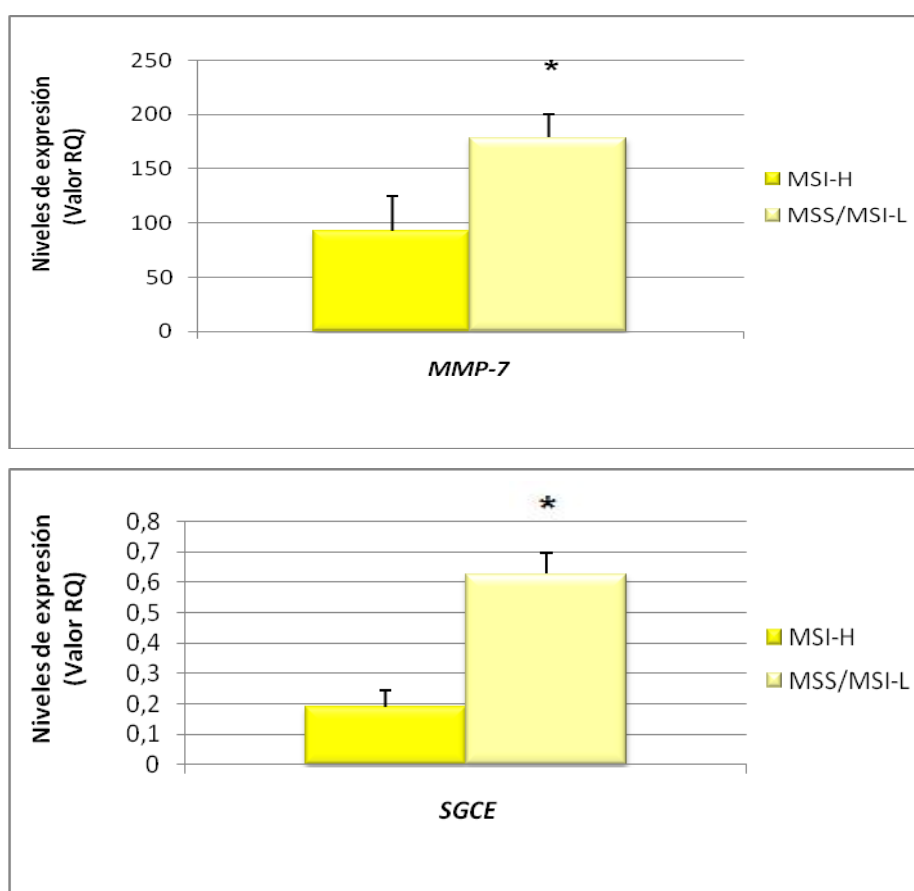


Figura X. Representación de los valores RQ para los genes de matriz extracelular y adhesión celular con diferencias significativas por PCR cuantitativa a tiempo real. Como se puede observar, los tumores MSI-L/MSS muestran mayor nivel de expresión en los dos casos considerados.

3.2.2 Estudio de la relación de los datos de expresión y las características clínicas en los tumores MSI-L/MSS

Esta parte del estudio se volvió a centrar en el grupo de tumores con baja o nula inestabilidad en microsatélites. Se compararon los datos de expresión ($\Delta\Delta Ct$ ó ΔCt) proporcionados por la técnica de PCR cuantitativa para los genes *SGCE* y *MMP-7*, en relación con el estadio de Dukes, grado de invasión ganglionar, localización y tamaño del tumor, así como la detección de recidivas y metástasis en los pacientes. En el análisis estadístico se tuvo en cuenta la normalidad o no de los datos para la elección del estadístico correspondiente. Se emplearon los modelos de ANOVA y

Kruskal-Wallis para el estudio de todos los factores (Tablas XVI, XVII, XVIII, XIX XX y XXI). Como nota aclaratoria cabe destacar que todos los resultados relativos a los datos de expresión de *MMP-7* presentan valores de $\Delta\Delta\text{Ct}$ negativos. Siguiendo el esquema de razonamiento que venimos empleando, $\Delta\Delta\text{Ct}$ es el resultado de la diferencia del valor ΔCt del tumor y el valor ΔCt del *pool* de muestras no tumorales. Por ello un valor negativo de $\Delta\Delta\text{Ct}$, implica que el ΔCt del tumor es menor que el del *pool* de muestras normales, esto es, el tumor expresa más *MMP-7* que el *pool* de muestras normales. Por otro lado, cuanto más negativo sea el valor del $\Delta\Delta\text{Ct}$, menor será el valor de ΔCt y, por tanto, mayor será su dato de expresión.

Tras el estudio de las diferencias de expresión de *SGCE* y *MMP-7* en relación a los datos clínicos de los tumores, no se encontraron diferencias significativas salvo cuando se estudió la expresión de *MMP-7* en función de la presencia o no de metástasis (Tabla XXI). Como se observa, dentro de los tumores estables para microsatélites, a mayor expresión de este gen, mayor es la posibilidad de desarrollo de metástasis ($P = 0,047$). Por otro lado, la expresión de *MMP-7* muestra asociación estadística con el estadio tumoral ($P = 0,042$, ANOVA, Tabla XVI). Además, al comparar cánceres colorrectales clasificados como estadio de DUKES A con el grupo estadio de DUKES D, se observaron diferencias significativas en la expresión de *MMP-7* ($P = 0,010$, *t-Student*).

La Tabla XVII resume el estudio de diferencias de expresión de *MMP-7* y *SGCE* respecto al grado de infiltración ganglionar. El grupo N2 de infiltración ganglionar contaba con solo tres casos. En un análisis posterior, no reflejado en la Tabla, se reagruparon los datos de los tumores con grado de infiltración ganglionar N2 y los N1. Comparando este nuevo grupo N2 con N0, respecto a los niveles de expresión de *MMP-7* y *SGCE*, los resultados continuaron sin alcanzar significación estadística. Paralelamente, la Tabla XIX muestra el resultado tras el estudio estadístico de la expresión de *MMP-7* y *SGCE* en función del tamaño del tumor. El tamaño del tumor T4 contaba sólo con un caso, mientras que no existían casos de T1. Por ello se procedió a analizar el tamaño del tumor respecto a la expresión de *MMP-7* y *SGCE* reagrupando

T4 con T3. Este nuevo grupo T3 se comparó con el tamaño T2. El análisis no mostró diferencias significativas de expresión entre ambos grupos.

GEN	ESTADIO DE DUKES	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)		
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	P
<i>MMP-7</i>	A	-5,66 (0,74)	-7,73 — 3,59	0,042
	B	-7,15 (0,43)	-8,09 — -6,21	
	C	-5,85 (0,86)	-8,08 — -3,63	
	D	-8,04 (0,26)	-8,71 — -7,38	
<i>SGCE</i>	A	1,96 (0,36)	0,96 — 2,96	0,348
	B	0,99 (0,32)	0,29 — 1,71	
	C	1,51 (0,46)	0,31 — 2,70	
	D	1,09 (0,39)	0,08 — 2,11	

Tabla XVI. Estudio de la relación entre la expresión génica y el estadio Dukes de los tumores MSI-L/MSS.

GEN	INFILTRACIÓN GANGLIONAR	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)		
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	P (0,1)
MMP-7	N0	-7,05 (0,35)	-7,79 — -6,32	0,900
	N1	-6,79 (0,94)	-9,58 — -4,50	
	N2	-6,57 (0,41)	-11,74 — -1,39	
SGCE	N0	1,31 (0,24)	0,81 — 1,82	0,650
	N1	1,13 (0,37)	0,21 — 2,04	
	N2	1,91 (0,80)	-8,30 — 12,11	

Tabla XVII. Análisis de la expresión de *MMP-7* y *SGCE* en relación con la infiltración ganglionar en tumores estables en microsatélites. La similitud de las medias y los intervalos de confianza explican la falta de significación estadística.

GEN	LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)		
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	P
MMP-7	Colon derecho	-7,10 (0,47)	-8,26 — -5,93	0,264
	Colon izquierdo	-5,57 (1,54)	-10,48 — -0,66	
	Recto	-7,10 (0,35)	-7,87 — -6,34	
SGCE	Colon derecho	1,61 (0,37)	0,70 — 2,52	0,639
	Colon izquierdo	1,66 (0,44)	0,26 — 3,05	
	Recto	1,21 (0,31)	0,55 — 1,87	

Tabla XVIII. Análisis estadístico de la expresión de *MMP-7* y *SGCE* respecto a la localización tumoral.

GEN	TAMAÑO DEL TUMOR REAGRUPADO	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)		
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	P
MMP-7	T2	-6,60 (0,67)	-8,31 — -4,88	0,575
	T3	-7,01 (0,39)	-7,83 — -6,19	
SGCE	T2	1,51 (0,41)	0,46 — 2,55	0,598
	T3	1,29 (0,23)	0,81 — 1,77	

Tabla XIX. Relación entre la expresión de *MMP-7* y *SGCE* y el tamaño del tumor tras la reagrupación del tamaño T4 con T3.

GEN	RECIDIVA	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)		
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	P
MMP-7	0	-7,06 (0,33)	-7,77 — -6,35	0,362
	1	-6,26 (1,21)	-9,83 — -2,69	
SGCE	0	1,48 (0,27)	0,90 — 2,05	0,654
	1	7,78 (0,41)	0,48 — 3,08	

Tabla XX. Estudio de las diferencias de expresión de *MMP-7* y *SGCE* respecto a la aparición o no de recidivas en tumores colorrectales con baja o nula inestabilidad en microsatélites.

GEN	METÁSTASIS A DISTANCIA	NIVELES DE EXPRESIÓN ($\Delta\Delta Ct$)		
		MEDIA (error estándar)	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA (95 %)	P
<i>MMP-7</i>	0	-6,58 (0,60)	-7,98 — -5,18	0,047
	1	-8,10 (0,31)	-8,95 — -7,24	
<i>SGCE</i>	0	1,72 (0,21)	1,23 — 2,21	0,140
	1	1,01 (0,47)	-0,30 — 2,32	

Tabla XXI. Relación entre la expresión de *MMP-7* y *SGCE* en tumores estables o con baja inestabilidad para microsatélites en función de la presencia o no de metástasis.

Se realizaron también estudios de supervivencia, considerando intervalos libres de enfermedad, con objeto de analizar la influencia de *MMP-7* y *SGCE* en la aparición de recurrencias tumorales en el grupo de tumores MSI-L/MSS. En estos análisis, se obviaron los pacientes clasificados como Dukes D y aquellos con una supervivencia menor de 0,5 meses. La expresión de ambos genes se clasificó como “baja” o “alta” empleando el percentil 50 como punto de corte. Así el 33,3 % y el 30,8 % de pacientes recidivaron considerando los casos de “alta” expresión, para los genes *SGCE* y *MMP-7*, respectivamente. Para aquellos catalogados como de “baja” expresión, recidivaron el 11,1 % en relación al gen *SGCE* y el 12,5 % para *MMP-7*. Ambos resultados no fueron significativos (*SGCE* P = 0,182 y *MMP-7* P = 0,275).

4. ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS MICROSATÉLITE DEL PROMOTOR DE *MMP-7*

Para el estudio de las secuencias microsatélite localizadas en el promotor de *MMP-7*, se amplificó una zona del promotor con ayuda de unos cebadores previamente diseñados (Jormsjö et al, 2001). En la zona estudiada existen dos microsatélites mononucleotídicos, A₇ y A₉ (ver Figura 7 de Material y Métodos).

Se llevó a cabo este análisis en 10 muestras tumorales inestables para microsatélites, y en sus correspondientes muestras no tumorales. Tras la amplificación del fragmento objeto de estudio y su posterior purificación, se secuenciaron todas las muestras con los cebadores descritos en el punto 6 de Material y Métodos. Ninguna de las muestras estudiadas mostró alteración alguna en las secuencias microsatélite comparando las muestras tumorales y las no tumorales (Figura XI).

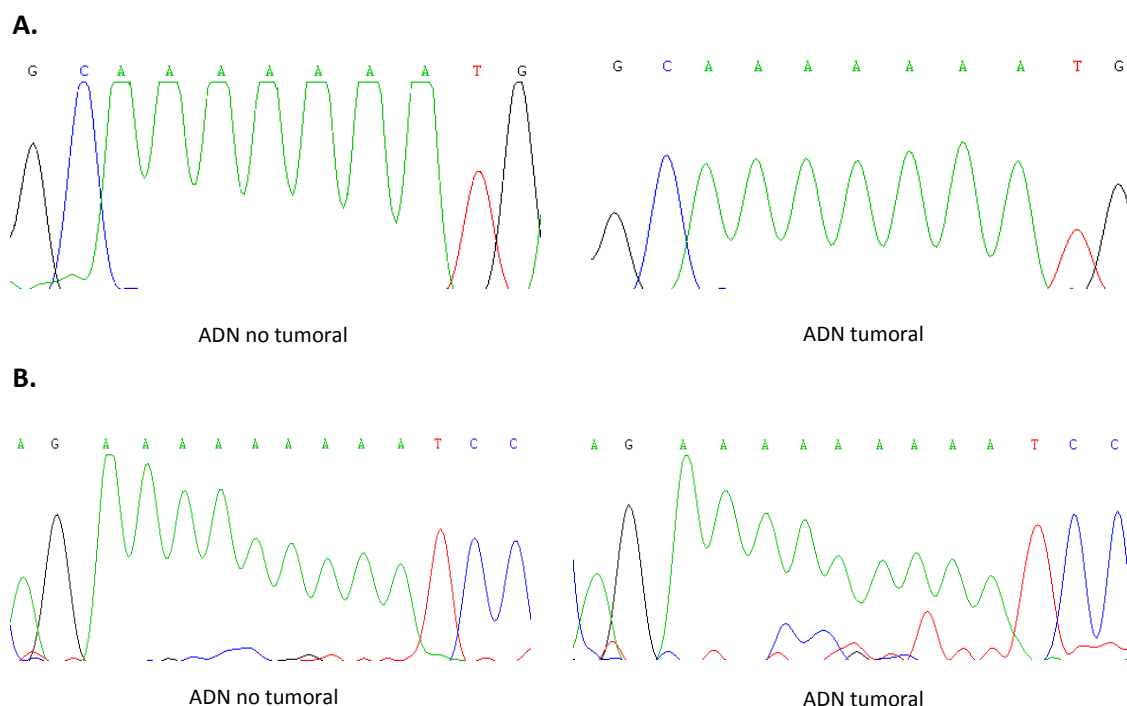


Figura XI. Ejemplos de los resultados de la secuenciación del fragmento del promotor de *MMP-7* en muestras MSI-H. **A.** Representación de la secuenciación de las repeticiones de A₇ en una muestra no tumoral y su correspondiente tumor. **B.** Secuencias de muestras no tumoral y tumoral para el microsatélite A₉. Todas las muestras mantuvieron la secuencia de A₇ y A₉ en la secuencia no tumoral y tumoral.

5. ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO: ACTIVACIÓN DE LA VÍA WNT CON WNT3a EN LÍNEAS CELULARES TRANSFECTADAS CON *shRNA* (TCF REPORTER ASSAY)

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES MSI-H Y MSI-L/MSS

A partir del estudio previo de expresión de los genes relacionados con la vía WNT con ARNm procedente de tumores humanos, se seleccionaron siete genes que mostraban niveles de expresión diferencial entre tumores MSI-H y MSI-L/MSS. Todos ellos, salvo el gen *WIF1*, se expresaban en niveles más bajos en los tumores estables o con baja inestabilidad en microsatélites. Con el fin de conocer la posible influencia de estas moléculas en la regulación de la cascada de señalización de la vía WNT, se realizó un estudio en cultivos de líneas celulares humanas de cáncer colorrectal.

Para los ensayos *in vitro* se emplearon diversas líneas celulares humanas de cáncer de colon clasificadas en función de su inestabilidad en microsatélites. Así, las líneas celulares estudiadas fueron HCT-15, HCT-116 y RKO como modelos tumorales MSI-H, y CACO2 y SW480 en el caso del tipo tumoral MSI-L/MSS. Sobre estas células se analizaron los niveles de expresión de los genes relacionados con la vía WNT que previamente habían demostrado diferencias significativas *in vivo*. Dicho análisis se llevó a cabo por PCR cuantitativa a tiempo real (Figura XII).

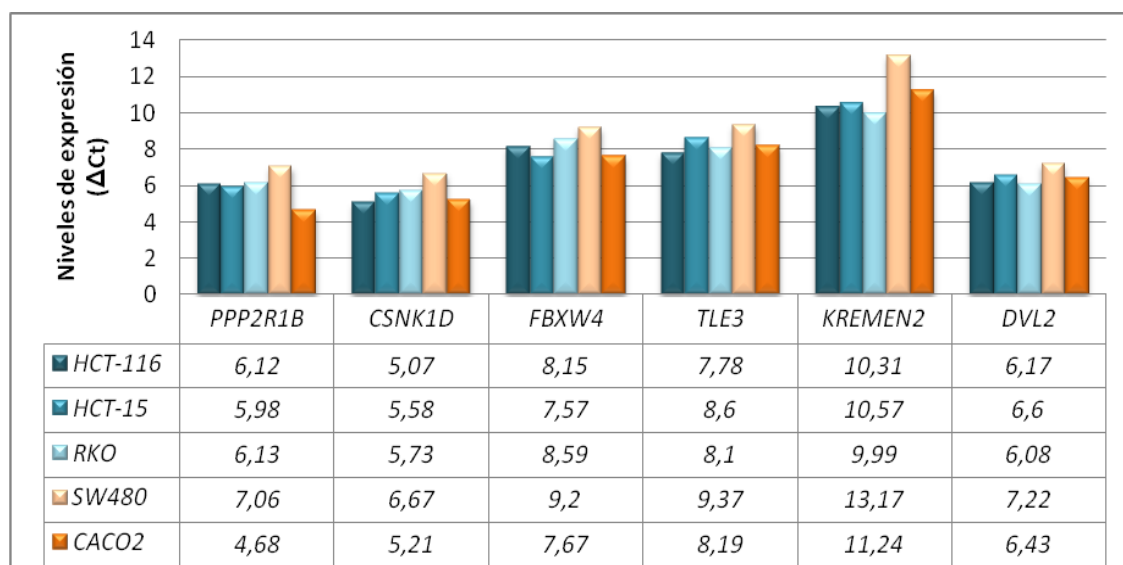


Figura XII. El diagrama de barras representa los ciclos de amplificación para cada uno de los genes estudiados en las diferentes líneas celulares (MSI-H = tonos turquesa; MSI-L/MSS = tonos naranjas). Como se puede apreciar, los ciclos entre las líneas MSI-H son bastante homogéneos. La línea celular CACO2, a pesar de ser MSI-L/MSS, se aproxima al perfil de expresión de alta inestabilidad. Los ciclos más altos corresponden a la línea SW480 que, por tanto, muestra menor expresión de los genes objeto de estudio.

A la vista de los resultados obtenidos pudimos confirmar la tendencia de expresión observada en los tumores *in vivo*. Los seis genes estudiados, a excepción de *WIF1*, mostraban niveles de ARNm mayores en las líneas celulares con alta inestabilidad en microsatélites (MSI-H) frente a las líneas con baja inestabilidad o estables (MSI-L/MSS). Para el caso de *WIF1*, no se obtuvieron valores de expresión detectables en ninguno de los casos, salvo en las células CACO2 ($\Delta C_t = 15,89$).

El siguiente objetivo que se planteó en esta tesis fue averiguar el efecto que provocaba la pérdida de expresión de los genes objeto de estudio (*PPP2R1B*, *CSNK1D*, *FBXW4*, *TLE3*, *KREMEN2*, *DVL2*) en la activación de la vía WNT. Esos genes disminuían su expresión en los tumores MSI-L/MSS y quisimos investigar si este hecho podría ayudar a explicar una mayor activación de la vía WNT y, por ello, el peor pronóstico asociado a este tipo tumoral. Para ello, se eligió la línea celular RKO, dadas sus características respecto a ausencia de mutaciones en *APC* y β -catenina (*CTNNB1*). Así,

se establecieron experimentos de inhibición génica por medio de *shRNAs*. Además, esta línea celular es MSI-H, lo cual permitiría comprobar si la supresión de los genes estudiados cambiaba de alguna manera el genotipo de dichas células. Para todos los genes, se trabajó con una pareja de líneas celulares generadas, una correspondiente a un clon con el gen problema inhibido y otra transfectada con el vector control proporcionado por la casa comercial como control. El nivel de inhibición de cada uno de los genes ensayados se confirmó por PCR cuantitativa a tiempo real.

5.2 ENSAYO TCF *REPORTER* TRAS LA INHIBICIÓN DE *PPP2R1B* EN LA LÍNEA CELULAR RKO

En primer lugar se generó una pareja de líneas celulares, correspondiendo una de ellas al clon con el gen *PPP2R1B* inhibido en las células RKO y, por otro lado, la misma línea celular transfectada con el plásmido control correspondiente. Se trabajó con un clon celular que mostró un porcentaje de inhibición de, al menos, un 70 % del gen *PPP2R1B*. Esa pareja de líneas celulares se transfectó con el TCF *reporter* que da idea del nivel de activación de la vía WNT por expresión de luciferasa, ya que posee los sitios de unión para TCF-4, exclusivos de la vía WNT. Una vez transfectadas las células, se procedió a estimularlas con la proteína WNT3a recombinante humana a distintos tiempos: 24, 48 y 60 horas.

Los resultados obtenidos tras la estimulación con WNT3a en el clon de células con *PPP2R1B* inhibido quedan reflejados en la Figura XIII. El efecto observado es una inhibición de la actividad de la vía. A las 24 horas ya se observa un descenso del 60 % de la señal en comparación con el clon control. Se alcanzan niveles de hasta un 92 % en el clon con el gen inhibido en comparación con la línea celular control a las 60 horas de la estimulación inicial con WNT3a. Estos datos implicarían que la proteína que codifica *PPP2R1B* sería un regulador positivo de la vía, puesto que su inhibición provoca un descenso en la actividad de la vía.

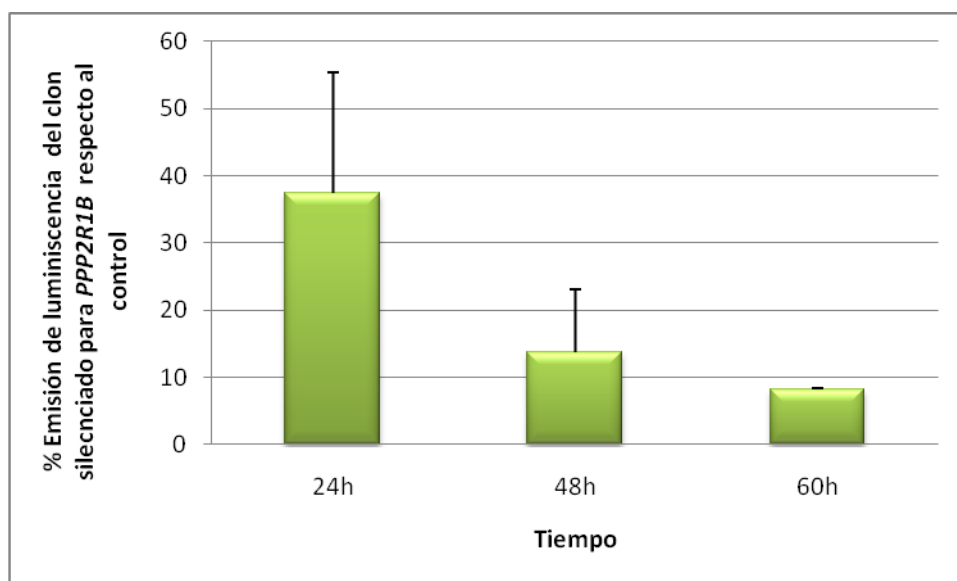


Figura XIII. Representación de la relación de luminiscencia emitida por el clon de células inhibido en *PPP2R1B* respecto al control. Las barras indican la luminiscencia emitida por las células, normalizada con la emisión de *Renilla*, tras la estimulación con WNT3a a diferentes tiempos. En esta gráfica se aprecia la reducción de emisión de luz por luciferasa del clon respecto al control, por lo que deducimos que el gen inhibido, *PPP2R1B*, ejerce una regulación positiva en la activación del vía.

5.3 ENSAYO TCF *REPORTER* TRAS LA INHIBICIÓN DE *FBXW4* EN LA LÍNEA CELULAR RKO

Se generaron los clones de células de forma similar a lo explicado en el apartado anterior, es decir, un clon con el gen *FBXW4* inhibido, al menos, un 70 % y otro con el plásmido control correspondiente. A continuación se transfectaron las células con los plásmidos proporcionados por el TCF *reporter assay*. Como en el caso anterior, las células fueron estimuladas con la proteína recombinante humana WNT3a a los tiempos de 24, 48 y 60 horas.

La Figura XIV detalla los resultados obtenidos en este nuevo ensayo. La interpretación que se desprende de esta Figura es que la proteína que codifica *FBXW4* ejerce de reguladora negativa de la vía WNT. La inhibición de *FBXW4* induce a un incremento de actividad de la vía de hasta un 328 % a las 60h, en comparación con su

línea celular control. La ausencia de esta proteína potencia la actividad de la señalización WNT, luego su presencia influiría de forma negativa en la activación.

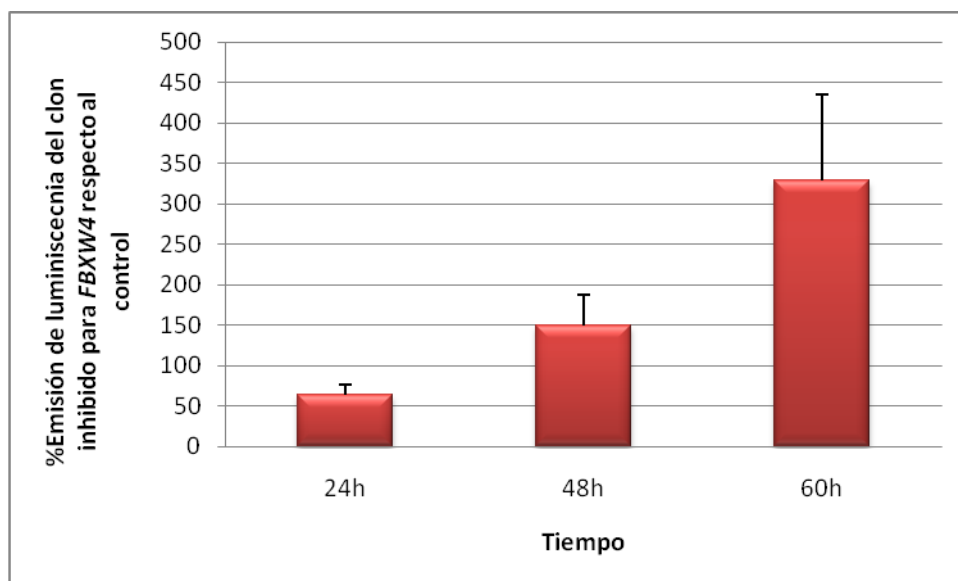


Figura XIV. Representación de la relación del clon celular inhibido para *FBXW4* respecto a su clon control, en función de la emisión de luz por la síntesis de luciferasa a distintos tiempos. Se observa como a lo largo de la estimulación con WNT3a, la relación de luminiscencia emitida por el clon inhibido, respecto a la luminiscencia emitida por el plásmido control, va en aumento.

5.4 ENSAYO TCF *REPORTER* TRAS LA INHIBICIÓN DE *DVL2* EN LA LÍNEA CELULAR RKO

Este experimento se llevó a cabo con un clon en el que el gen *DVL2* presentaba una inhibición superior al 70 %, según datos de PCR cuantitativa a tiempo real. En paralelo se llevó como control una línea celular con la misma construcción plasmídica, pero con un inserto diferente, de modo que no inhibiese al gen diana. Estos dos clones de células fueron transfectados según el protocolo descrito para el TCF *reporter assay* y, posteriormente, estimuladas con la proteína recombinante WNT3a a 24, 48 y 60 horas.

La Figura XV describe la evolución de la señal de luciferasa, normalizada con la emisión de luz ocasionada por Renilla, a lo largo del tiempo. A las 48 horas se observa

un descenso de, aproximadamente, la mitad de la señal de luminiscencia ($P = 0,155$). A las 60 horas, esa inhibición de la actividad β -catenina/TCF-*reporter* se mantiene en el tiempo. Estos datos indicarían que el gen *DVL2* actúa como un regulador positivo de la vía.

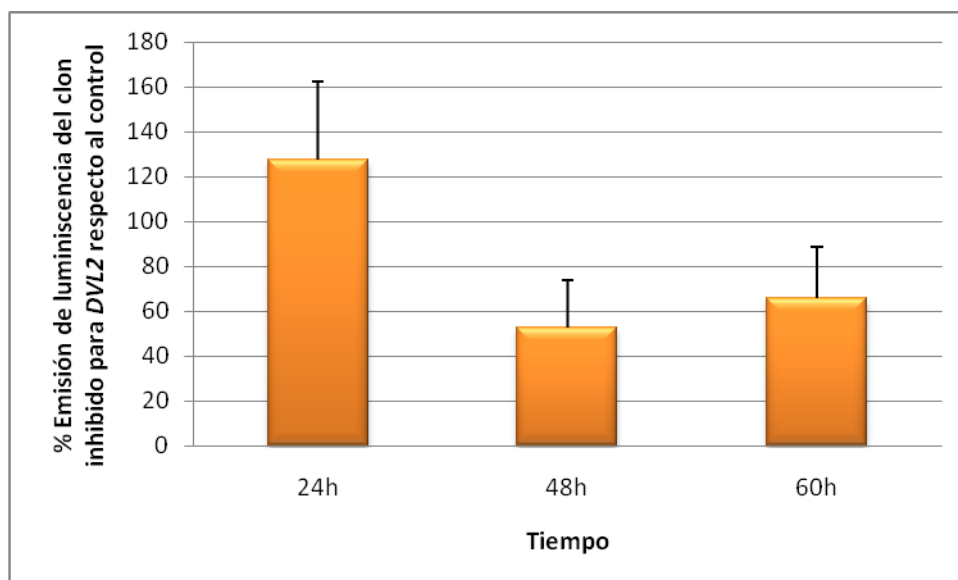


Figura XV. Representación gráfica de la señal de luciferasa normalizada por *Renilla* para la línea celular RKO con *DVL2* silenciado. La señal lumínica desciende hasta un 50 % a las 48 horas de la estimulación con WNT3a.

DISCUSIÓN

Fenotipo mutador y vía supresora son los dos procesos carcinogénicos principales por los que se desarrollan la amplia mayoría de los tumores colorrectales humanos. Como ya se ha descrito previamente, la vía del fenotipo mutador presenta alteraciones en los genes de reparación del ADN del *Mismatch Repair System*. Entre las dianas del fenotipo mutador descritas en este tipo de tumores encontramos *TGF β RII*, *IGF2R*, *BAX*, *MSH3*, *MSH6*, *caspasa 5*, *E2F-4*, *TCF-4*, *BCL10*, *cdx-2*, *axina* y *hRAD50*. Por otro lado, la vía supresora desarrolla alteraciones en otro tipo de genes, proto-oncogenes y genes supresores del crecimiento como *k-ras*, *p53* y *APC*, así como LOH en 5q, 17p y 18q (Revisado por Dionigi et al, 2007). Ambas vías presentan, por tanto, diferentes características genotípicas. Dichos signos genéticos de ambos tipos de tumores se detectan en etapas tempranas del proceso carcinogénico y se multiplican a medida que el tumor incrementa su tamaño (Lengauer et al, 1998). Los tumores con deficiencia en el sistema MMR son diploides, mientras que los tumores de la vía del fenotipo supresor tienen aneuploidía, además de las ya consabidas diferencias clínico-patológicas. Efectivamente, el distinto pronóstico que poseen tumores estables e inestables en microsatélites fue el punto de partida por el que nuestro grupo de investigación ha estado involucrado en el estudio de las distintas causas moleculares que imprimen las mencionadas diferencias clínicas.

La vía WNT es una vía proliferativa que en condiciones normales participa en la regulación de la homeostasis del epitelio del colon, entre otras funciones. Giles et al, (2003) afirman que más del 90 % de los tumores colorrectales albergan una mutación activante en alguno de los componentes de esta cascada de señalización que conduciría, en último término, a la estabilización de la molécula efectora, β -catenina. De hecho, un elevado porcentaje de tumores colorrectales, tanto esporádicos como hereditarios, muestran mutaciones en *APC* (Miyoshi et al, 1992, Powell et al, 1992), molécula esencial en la regulación de β -catenina. En un menor número de casos, en los que *APC* se mantiene inalterado, se han encontrado mutaciones en los sitios de fosforilación de β -catenina que le permiten ser refractaria al complejo de degradación del que la propia proteína APC forma parte (Morin et al, 1997).

No obstante, a pesar de la amplia bibliografía disponible respecto a los múltiples puntos de regulación de la vía WNT y sobre las dos principales vías carcinogénicas en cáncer colorrectal, existen pocos trabajos que relacionen ambos aspectos. Es evidente que la cascada de activación WNT desempeña un papel primordial en la homeostasis del epitelio intestinal, y que su desregulación tiene una importante implicación en cáncer. La búsqueda realizada en este trabajo de posibles diferencias de la vía WNT en tumores desarrollados a través de la vía del fenotipo mutador o de la vía supresora proporciona datos nuevos que pueden ayudar a comprender el diferente pronóstico clínico que confieren ambos tipos tumorales a los pacientes afectados.

Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha publicado trabajos encaminados a estudiar las diferencias existentes, en cánceres colorrectales con y sin inestabilidad en secuencias microsatélite, en relación a moléculas implicadas en adhesión celular e invasión, como la E-cadherina y determinadas MMPs (Ortega et al, 2008, Morán et al, 2005, Morán et al, 2002). Las moléculas de adhesión, como integrinas, cadherinas, así como las MMPs, constituyen dianas importantes de estudio por su implicación en la transición epitelio-mesénquima y, por tanto, en las metástasis tumorales. Por esta razón, parte del trabajo desarrollado en esta Tesis indaga en la búsqueda de posibles diferencias respecto a estas moléculas en tumores colorrectales de la vía supresora y del fenotipo mutador.

1. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS CON LA VÍA WNT EN CÁNCERES COLORRECTALES MSI-H Y MSI-L/MSS

Nuestros resultados han revelado claras diferencias, en cánceres colorrectales con y sin inestabilidad en microsatélites, en la expresión de genes relacionados con la vía WNT. A continuación, se discuten diferentes aspectos relativos a las moléculas con expresión diferencial en ambos tipos de cánceres colorrectales esporádicos.

1.1 Caseína quinasa Id

La caseína quinasa I (CKI) es una serina/treonina quinasa de estructura monomérica que fosforila una gran variedad de sustratos denominados “segundos mensajeros”. Se conocen varios miembros de esta familia. En el trabajo desarrollado en esta Tesis, encontramos que los niveles de ARNm de la isoforma CKI δ (*CSNK1D*) son mayores en tumores MSI-H frente a tumores MSI-L/MSS, siendo los niveles de expresión en los tumores con alta inestabilidad próximos a los encontrados en el conjunto de muestras no tumorales empleadas como control. CKI posee diversas isoformas y, aunque se pueda deducir una similar especificidad de sustratos dada la conservación del dominio quinasa entre las isoformas, la bibliografía existente no es concluyente al respecto. Además, la proporción de trabajos que hablan exclusivamente de la isoforma objeto de estudio no es elevada, y siempre se encuentra relacionada principalmente con CKI ϵ con la que comparte el 98 % de identidad respecto a su dominio catalítico y un 53 % del dominio C-terminal (Fish et al, 1995).

CKI es la responsable de la fosforilación de Ser45 del exón 3 de β -catenina (Amit et al, 2002), con lo cual surgiría como un claro regulador negativo de la vía. Sin embargo, el planteamiento no es tan sencillo. Amit et al, (2002) observan que tanto la isoforma α , como la β y la ϵ , son capaces de fosforilar a β -catenina en el residuo Ser-45, favoreciendo las consecuentes fosforilaciones por GSK3 β . Este mismo trabajo emplea un dominante negativo para CKI ϵ , además de un inhibidor específico contra la misma isoforma, hecho que conduce a la pérdida de fosforilación de Ser45 en células 293. Otros trabajos encuentran similares resultados, al observar una activación de la vía cuando deplecionan CKI α (Liu et al, 2002) o CKI α/ϵ (Yanagawa et al, 2002) en embriones de *Drosophila*. No obstante, respecto a CKI ϵ , se la ha considerado como un reguladora positiva de la cascada WNT. CKI δ/ϵ fosforilan a DVL2 (Bryja et al, 2007c). También, tanto CKI ϵ como CKI δ son capaces de interaccionar con DVL-1, proteína a la cual son capaces de fosforilar, aunque la interacción de CKI δ no parece tan fuerte como la de la isoforma ϵ (Gao et al, 2002). Este hecho implicaría un papel positivo en cuanto a la regulación, pero este mismo trabajo también encuentra fosforilaciones en

APC, axina y β -catenina, si bien estos autores consiguen inhibir la degradación de β -catenina al emplear una construcción de CKI ϵ sin el dominio C-terminal, responsable de la inhibición de la actividad quinasa. En cuanto a CKI δ , se encontró una mutación en R324H del gen *CSNK1D* que, pese a su cercanía respecto al dominio autoinhibitorio C-terminal de la quinasa, no produjo incremento en un ensayo sobre la actividad del cofactor transcripcional Lef-1. No obstante, dicha mutación sí potenciaba la formación de pólipos en los tumores de colon estudiados aunque, por el hecho anterior, de forma independiente a la regulación WNT (Tsai et al, 2007). Sin embargo, en un trabajo reciente, la inhibición de CKI δ/ϵ , si bien reducía los niveles de DVL-2 fosforilado, no afectaba a la activación de β -catenina (Bryja et al, 2007b).

Por otro lado, CKI no solo está relacionada con la fosforilación de β -catenina y DVL. CKI ϵ es capaz de fosforilar a LRP6, correceptor de la vía WNT, mientras que CKI α es incapaz de interaccionar con dicha proteína. La fosforilación de CKI ϵ en los sitios Ser 1420 y Ser 1430 de LRP6 produce una regulación negativa de la vía, dado que las mutaciones en estos sitios estabilizan β -catenina (Swiatek et al, 2006). Sin embargo, LRP6 también es fosforilado por GSK3 β y CKI (Zeng et al, 2005). En este caso, las fosforilaciones ocurren en los sitios PPPS/TP de LRP6. Se sabe que LRP6 fosforilado se une con mayor afinidad a axina (Tamai et al, 2004), con lo cual el complejo de degradación se desestabilizaría y β -catenina se acumularía pasando al núcleo. Zeng et al, (2005) emplean dominantes negativos para CKI α y CKI δ/ϵ , encontrando que ambos son necesarios para la fosforilación de LRP6. En este caso, los autores sí encuentran que CKI α actúe sobre LRP6 y las tres isoformas vendrían a desempeñar funciones redundantes como reguladores positivos de la vía. La explicación se da sobre este fenómeno consiste en que consideran que GSK3 β y CKI muestran una asociación a membrana dependiente del estímulo WNT, o bien sería posible que WNT regulase una fosfatasa que actuase en este punto de fosforilaciones sobre LRP6.

Otra de las dianas de CKI δ es la proteína APC. En este caso, la fosforilación de APC por CKI δ favorece la afinidad de APC por β -catenina a nivel nuclear (Sierra et al, 2006). En este trabajo se observó que este hecho beneficiaba la disociación de β -

catenina de coactivadores transcripcionales y su unión a los correspondientes represores.

Es evidente que existe un papel dual en cuanto a CKI respecto a su función en la regulación de la vía WNT, ya señalado por Amit et al, (2002). CKI regularía negativamente la vía gracias a su capacidad de unión a axina, favoreciendo la fosforilación y degradación de β -catenina. Tras la estimulación con algún ligando WNT, CKI favorecería la estabilidad de β -catenina. Nuestros resultados indican que *CSNK1D* se expresa a menor nivel en tumores MSI-L/MSS que en tumores MSI-H y, dada su dualidad de funciones, estos datos podrían ser indicativos de una función de CKI como regulador negativo de la vía WNT. La pérdida de expresión de dicho gen en tumores estables favorecería la estabilidad de β -catenina, activándose la cascada WNT. No obstante, es a su vez destacable su papel de regulador positivo en la vía, fosforilando a LRP6 y DVL.

1.2 Isoforma β de la subunidad A de la fosfatasa PP2A

El gen *PPP2R1B* corresponde a la isoforma β de la subunidad A de la fosfatasa PP2A. Esta fosfatasa existe en dos formas, como núcleo catalítico, comprendido como la estructura formada por la subunidad catalítica C y la subunidad reguladora A, y como holoenzima, que cuenta además con la subunidad B, también reguladora. Cada subunidad cuenta con diferentes isoformas. La subunidad A se expresa como dos isoformas, α y β . (Arroyo and Hahn 2005; Zhou et al, 2003), siendo la isoforma α más abundante que la β (Hemmings et al, 1990). Se cree que la isoforma β podría estar relacionada con la organogénesis, puesto que se detecta mayor expresión en los oocitos de *Xenopus* (Hendrix et al, 1993). Por otro lado, se ha encontrado mayor expresión de esta subunidad en líneas celulares tumorales que en células normales (Zhou et al, 2003). En nuestros análisis detectamos una menor expresión de la subunidad β de la isoforma A en tumores estables o con baja inestabilidad en microsatélites, en comparación con tumores MSI-H.

En líneas generales se ha venido considerando a la enzima PP2A como supresora de tumores. El descubrimiento de que su inhibición, como resultado de la presencia del antígeno T, es esencial a la hora de transformar células humanas en cultivo fue determinante para tal consideración (Chen et al, 2004; Pallas et al, 1990). También se considera su actividad supresora de tumores en cuanto que su inactividad provocaría que P-AKT se acumulase en el núcleo inhibiendo la expresión de factores proapoptóticos como FOXO (Trotman et al, 2006). Sin embargo, también se han descrito holoenzimas que no actúan como tal, y además hay que tener en cuenta que la desregulación de uno solo de los complejos puede no ser suficiente para que se desencadene tumorigénesis (Eichhorn et al, 2009). Por ejemplo, la subunidad PR72/130 de PP2A se une a la proteína IQ-1, lo que promueve la unión β -catenina-CBP, que favorece la proliferación en células madre embrionarias de ratón, a expensas de la unión β -catenina-p300, que favorecería la diferenciación (Miyabayashi et al, 2007).

La inhibición de PP2A en células HEM provocó la pérdida de más del 50% de E-cadherina en membrana. De hecho, se ha comprobado que PP2A, E-cadherina y β -catenina colocalizan en la membrana plasmática. El tratamiento con ácido okadaico, inhibidor de PP2A, o el uso de siRNA frente a la subunidad A de PP2A provocó una interrupción de la adhesión celular (Takahashi et al, 2006). Esto fue debido a que dichos tratamientos disminuían la presencia de IQGAP1, proteína que media la adhesión célula-célula cuando es reclutada por E-cadherina.

La función de la fosfatasa PP2A en la regulación de la vía WNT no encuentra una definición concreta. Janssens y Goris, en su revisión, la sitúan hasta en un total de tres sitios diferentes con funciones opuestas según la señal de estimulación: en membrana, donde mantiene el complejo E-cadherina/ β -catenina; en el complejo de degradación donde, si está presente la subunidad B'/PR61, permanece inactiva o si no está, PP2A se activa pudiendo defosforilar a axina, APC e incluso a β -catenina; y por último se cree que actúa en el proceso de traslocación nuclear y actividad transcripcional de β -catenina (Janssens and Goris, 2001).

Algunos autores clasifican a PP2A como regulador negativo de la vía. Así, se ha visto que la actividad de esta enzima consistiría en defosforilar GSK3 β , favoreciendo la actividad de la quinasa, mientras que además sería capaz de unirse con DVL2, cuya unión, hipotetizan los autores, podría atenuar la actividad de PP2A. En este trabajo afirman que la inhibición de PP2A mimetiza el efecto que provoca la estimulación con WNT3a en la línea celular embrionaria de teratocarcinoma de ratón, F9 (Yokoyama and Malbon, 2007). Otros trabajos corroboran la capacidad de PP2A de defosforilar en Ser9 a GSK3 β , activándola (Lee et al, 2005). Li et al, concuerdan con el papel de regulador negativo de la vía al observar que la expresión de las subunidades B56 α , A o C, es suficiente para inhibir la actividad WNT ectópica. De hecho, observan una reducción de los niveles de β -catenina, debido a que PP2A es capaz de activar el complejo de degradación, por activación de GSK3 β (Li et al, 2001). En este mismo trabajo, los autores comprueban que PP2A es un componente más del complejo de degradación al conseguir la coimmunoprecipitación de las tres subunidades con axina. De hecho el dominio C-terminal de axina se une a la subunidad catalítica de PP2A, dominio por el cual PP2A es capaz de unirse a sí misma (Hsu et al, 1999). Gao et al, demuestran también que la inhibición de CKI ϵ mantiene la asociación de PP2A-C y PP2A-A al complejo de degradación de β -catenina (Gao et al, 2002). Otra de las subunidades reguladoras, PR61 β , no es capaz de inhibir la defosforilación que ejercería PP2A sobre axina y que perjudicaría la estabilidad de la proteína de anclaje. Por otro lado, PP2A-Pr61 β reduce la activación de TCF-4, aunque de forma independiente a la estabilidad de β -catenina (Yamamoto et al, 2001).

Sin embargo, también son numerosos los trabajos que detallan el papel como regulador positivo sobre la vía WNT de PP2A. Ratcliffe et al, muestran en sus experimentos que la subunidad catalítica de PP2A actúa potenciando la señal WNT al cooperar con Dsh en embriones tempranos de rana y al favorecer la actividad de un *reporter* con el gen de luciferasa en embriones de *Xenopus*. Sin embargo, la expresión de la subunidad PP2A-B' actúa como regulador negativo de la vía (Ratcliffe et al, 2000). La presencia de PP2A en el complejo de degradación se ha relacionado con la defosforilación de APC (Ikeda et al, 2000). No obstante, dicho evento no tiene una consecuencia clara, aunque se ha relacionado con una menor afinidad de APC por β -

catenina (Rubinfeld et al, 1996). En otro trabajo, la inhibición global de la fosfatasa por acción de la aspirina, redujo la expresión de *c-myc* y *ciclina D1*, dos de las dianas de la vía WNT, además de observar un descenso en la reserva citoplasmática de β -catenina (Bos et al, 2006), lo que sitúa a PP2A como potenciador de la vía WNT.

En general, la función de la fosfatasa PP2A suele estar influenciada por la isoforma que la compone. La isoforma β de la subunidad A, que es el objetivo de nuestro trabajo, está codificada en la región cromosómica 11q23. En esta región se han descrito pérdidas de heterozigosidad (LOH, *Loss of Heterozygosity*) en tumores de colon y de pulmón y en líneas tumorales de pulmón (Wang et al, 1999; Wang et al, 1998). En otros tumores como son cáncer de cérvix (Pulido et al, 2000) y de ovario (Wu et al, 1999), se descarta la presencia de LOH en lo que respecta a la región que codifica para *PPP2R1B*. Por otro lado, también se han detectado mutaciones en el gen *PPP2R1B* en tumores de mama, pulmón y melanoma (Calin et al, 2000). Concretamente, las mutaciones a nivel de la repetición número 13 de HEAT suponen una deficiencia de la unión de esta subunidad con la subunidad catalítica (Takagi et al, 2000). Estos resultados apoyarían una función inhibitoria de la fosfatasa en la tumorigénesis.

Nuestros resultados muestran unos niveles de *PPP2R1B* en tumores colorrectales MSI-H similares al conjunto de muestras no tumorales, mientras que los niveles descienden en el caso de tumores MSI-L/MSS. Dada la complicada definición en cuanto a la actividad fosfatasa de PP2A en lo referente a la vía WNT, nuestros resultados *in vivo* estarían en concordancia con aquellos de la bibliografía en los que se describen pérdidas de expresión de *PPP2R1B* como signo de tumorigénesis (Calin et al, 2000; Takagi et al, 2000; Wang et al, 1998; Wang et al, 1999). Además, a nivel *in vitro* existe en la bibliografía una secuencia de trabajos que mostrarían a PP2A como regulador negativo de la vía. Con esto, nuestros niveles de expresión en cánceres colorrectales ayudarían a explicar una mayor activación de la vía WNT en los tumores con peor pronóstico. Por el contrario, los resultados obtenidos con la inhibición de *PPP2R1B* mediante la técnica de *shRNA* y la posterior detección de activación de la vía mediante un *reporter* TCF, implicarían a PP2A como un regulador positivo. Así, la pérdida de expresión en los tumores con peor pronóstico, no ayudaría a revelar este

hecho. Si bien, es cierto que PP2A no solo actúa a nivel de la vía WNT. Se han citado ya trabajos que manifiestan la importancia de PP2A en adhesión (Suzuki and Takahashi 2006; Takahashi et al, 2006) y regulación del ciclo celular (Miyabayashi et al, 2007; Trotman et al, 2006; Chen et al, 2004; Pallas et al, 1990), donde quizá ejerza su papel supresor de tumores, en beneficio de los cánceres colorrectales que sí mantienen la expresión de esta subunidad y que confieren clínicamente un mejor pronóstico. Es más, en un trabajo de reciente publicación, se afirma que la falta de *PPP2R1B* permite el incremento en la proliferación de células HEK-TER (células humanas HEK que expresan *hTERT*, *HRAS* y el antígeno T grande) y facilita las mismas formas de tumores (Sablina et al, 2007). El mecanismo se debe a que PP2A-A β es el responsable de defosforilar a RalA, proteína G pequeña relacionada con transformación celular y progresión tumorigénica, que quedaría inactiva.

1.3 Transducin-like enhancer of Split 3

TLE3 o *Transducin-like enhancer of split* es una proteína relacionada con la regulación de la transcripción génica de las dianas de la vía WNT. Se conocen tres proteínas humanas TLE1, TLE2 y TLE3. Cavallo et al, demostraron que dTcf (*Drosophila* Tcf) actuaba como represor o activador en función de la presencia de Armadillo (homólogo de β -catenina en *Drosophila*). Así, la presencia de Armadillo favorecía la actuación como activador transcripcional de dTcf. Por el contrario, era la presencia de Groucho (homólogo de TLE en *Drosophila*) la que determina que dTcf actúe como represor transcripcional (Cavallo et al, 1998). De este modo, en un trabajo posterior, se probó que en ausencia de señal WNT, Lef-1 permanecía unido al dominio Q de TLE1. La presencia de β -catenina provocó el desplazamiento de TLE1, puesto que ambas proteínas comparten sitio de unión en Lef-1 (Daniels and Weis, 2005). En nuestra población de cánceres colorrectales MSI-H detectamos unos niveles de expresión de TLE3 similares al grupo de muestras normales, siendo estos tumores más bajos en tumores MSI-L/MSS.

El mecanismo de acción del complejo formado por las proteínas Groucho/TLE se basa en la polimerización de dichas proteínas junto con su unión a los cofactores

TCF/Lef-1. El complejo formado recluta factores modificadores de la cromatina, como la histona desacetilasa Rpd3, que libera residuos acetilo, reprimiendo la transcripción (Chen and Courey, 2000). El reclutamiento de histonas desacetilasas es un evento esencial para la capacidad de represión de Groucho/TLE (Arce et al, 2009). A continuación, un incremento en la presencia de β -catenina, por activación de la vía, desplazaría a TLE de su sitio de unión a TCF/Lef-1. En este punto se ha implicado la actuación de APC como proteína clave que permite la disociación de β -catenina de los coactivadores de la transcripción y su posterior unión a correpresores como TLE (Sierra et al, 2006). La misma APC funcionaría como chaperona de β -catenina (Sierra et al, 2006). Sin embargo, el modelo no está del todo aclarado. A partir de la bibliografía, podría ser válida la hipótesis de que el incremento inicial de β -catenina nuclear desplazase su unión de TLE para su posterior anclaje a TCF/Lef-1, si bien actuaría APC como agente inhibidor de la señal. No obstante, las variaciones en los niveles de TLE nucleares afectan a la actividad de β -catenina en un ensayo llevado a cabo mediante el *reporter* TOPFlash sobre líneas celulares de cáncer de colon. La mayor cantidad de TLE propició el mayor descenso en la actividad TOPFlash detectada (Arce et al, 2009).

En cuanto a su expresión, nuestros resultados apuntan a una mayor expresión, semejante al tejido normal, en tumores con alta inestabilidad en microsatélites frente a tumores colorrectales MSI-L/MSS. La pérdida de expresión de este gen, implicado en la regulación negativa de la vía WNT en los tumores de peor pronóstico, podría estar indicando una mayor activación de esta vía proliferativa en los tumores estables para microsatélites. Además, encontramos una significación estadística ($P = 0,027$) en cuanto a la expresión de *TLE3* en tumores colorrectales MSI-L/MSS con tamaño T3. Estos tumores de mayor tamaño, expresan menos este gen. Sin embargo, no existen muchos datos de expresión de este gen en la bibliografía. En tumores colorrectales se detectó expresión de las proteínas TLE junto con Notch1 (señalización Notch), no siendo así en el correspondiente tejido normal (Zagouras et al, 1995). Dado que la señal Notch permanece activa en células proliferativas no diferenciadas, estos autores explican que dichas células tumorales intentan mantener un estado indiferenciado al expresar Notch y TLE. Sin embargo, no fueron capaces de detectar la expresión concomitante de TLE en células de tumores pulmonares. En otro trabajo se detectó

sobre-expresión de una isoforma de TLE3 en tumores de próstata (Nakaya et al, 2007). Las isoformas que detectan en este trabajo provienen de procesamiento alternativo del gen que generan un codón de parada que da lugar a una proteína truncada. Estas proteínas pueden funcionar como reguladores negativos de la función normal de TLE.

1.4 F-box and WD repeat domain containing 4

FBXW4 (*F-box and WD repeat domain containing 4*) es un miembro de la familia de proteínas con secuencias *F-box* y repeticiones WD-40. Se le conoce también por otros nombres, entre ellos *SHFM3*. *Split-hand/foot malformation* (SHFM) o ectrodactilia es una enfermedad caracterizada por deformaciones en las extremidades, generándose ausencia de partes o dedos completos. El gen *FBXW4* o *SHFM3* es uno de los afectados en esta enfermedad (Everman et al, 2006). En concreto, sufre reorganizaciones genómicas consecuencia de las duplicaciones detectadas en el *locus* de este gen (de Mollerat et al, 2003; Everman et al, 2006). Dichas duplicaciones son dianas de NAHR (*NonAllelic Homologous Recombination*) que, cuando ocurren dentro de la propia cromátida donde se localiza el gen, generan deleciones (Osborne, 2008). Tampoco se han encontrado en los pacientes secuencias *Alu* que pudiesen apoyar la teoría de una recombinación homóloga (de Mollerat et al, 2003). Sin embargo, recientemente se ha visto que en el modelo murino para la dactilaplasia en el que se ve afectado el gen *SHFM3* no existe relación entre el ARNm de dicho gen y la expresión del fenotipo de la enfermedad. De hecho, en este modelo el gen posee dos retrotransposones *Dac1J* y *Dac2J*. El segundo de ellos provoca disminución del ARNm de *SHFM3*, que es independiente de la falta del fenotipo de la dactilaplasia (Kano et al, 2007). Los datos obtenidos a partir la población de tumores colorrectales estudiados en esta Tesis, indican una menor expresión de *FBXW4* en tumores MSI-L/MSS frente a los tumores MSI-H.

La bibliografía que se dispone de este gen no es muy extensa. A nivel génico, se localiza en el cromosoma 10q24 y se compone de 9 exones que varían en su tamaño. El gen completo ocupa 85 kb y posee un SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*), aunque sin aparente implicación fenotípica. La proteína se compone de 412 aminoácidos,

entre los que se cuenta un dominio F-box próximo al dominio N-terminal y cuatro repeticiones WD40. El gen posee, además, siete repeticiones del trinucleótido AGG en el extremo 5' de la secuencia. También se ha identificado un pseudogen localizado en el cromosoma 22. (Ilanakiev et al, 1999). Las proteínas codificadas, por la presencia del dominio F-box, están relacionadas con la degradación de proteínas de forma ubiquitin-dependiente, entre ellas, β -catenina. Recientemente se ha descrito que la disminución de ARN mensajero de *FBXW7*, otro gen de la familia, en muestras humanas de cáncer colorrectal se correlaciona con un incremento de la expresión de *c-myc* y de *ciclina E* (Iwatsuki et al, 2009). Además los pacientes con alta expresión de *FBXW7* presentaban un peor pronóstico. *FBXW7* ya había sido descrito previamente como un gen supresor de tumores, apareciendo mutado en una amplia variedad de tumores humanos, entre ellos el cáncer de colon (9% de los casos de este tipo tumoral presentaban mutaciones). Dichas mutaciones aparecían distribuidas en las regiones codificantes del gen, entre ellas las zonas de repeticiones de F-box y WD-40 (Akhoondi et al, 2007).

En nuestra población de tumores estables para microsatélites, el gen *FBXW4* aparece regulado a la baja en comparación con tumores MSI-H. Este hecho podría reflejar una mayor tasa de degradación de β -catenina en tumores con alta inestabilidad en microsatélites, que daría lugar a una baja cantidad de β -catenina disponible para translocarse al núcleo y activar la vía. Por tanto, los tumores MSI-L/MSS tendrían mayor tasa de β -catenina disponible para pasar al núcleo y activar la transcripción génica consecuente con la activación WNT. Este hecho estaría de acuerdo con lo publicado por Iwatsuki et al, (2009) para *FBXW7*. Nuestro posterior ensayo *in vitro* sobre las células RKO corrobora esta hipótesis, dado que, al disminuir la expresión de dicho gen, conseguimos una sobreactivación de la vía en comparación con las células control (células que poseían el plásmido sin el correspondiente *shRNA* para *FBXW4*). Es decir, la inhibición de *FBXW4* en las células RKO produjo un incremento de la señal WNT probablemente debido a una mayor disponibilidad de β -catenina para su translocación nuclear. Paralelamente, explicaría una mayor activación de la cascada en pacientes con cáncer colorrectal con menores niveles de *FBXW4*, contribuyendo a su peor pronóstico.

1.5 Dishevelled 2

DVL2 o *Dishevelled-2* es otro de los genes que mostró diferencias significativas entre los dos grupos de tumores colorrectales estudiados en esta Tesis. Su expresión se ha relacionado principalmente con la activación de la señal WNT. Los datos de expresión en la población de tumores analizada indican una mayor expresión de *DVL2* en tumores MSI-H en comparación con tumores MSI-L/MSS. Dvl es capaz de unirse al receptor Fz a través de su dominio PDZ (Wong et al, 2003) y a axina (Li et al, 1999). Por un mecanismo todavía no comprendido en su totalidad, se cree que este hecho ayuda a la desestabilización del complejo de degradación y, con ello, a la activación de la señal. De hecho, el extremo C-terminal miristoilado de DVL es capaz de reclutar axina a la membrana (Cong et al, 2003). Estudios posteriores corroboran que *DVL2* colocaliza con axina, a la que se une a través del dominio DIX. Por otro lado, el dominio DEP es esencial para que *DVL2* pueda activar la señal de la vía (Schwarz-Romond et al, 2007). Es más, la coexpresión de DVL y CK1 ϵ estimula la cascada de forma sinérgica (Schwarz-Romond et al, 2007; Cong et al, 2003).

No obstante, DVL podría ser prescindible a la hora de activar la señal WNT. Se ha comprobado que estimulaciones con Wnt3a, a baja concentración y tiempos cortos, estimularían la cascada de forma DVL y CK1 δ/ϵ independiente. Así mismo, altas concentraciones del ligando a tiempos más extensos, sí activarían el complejo DVL - CK1 δ/ϵ (Bryja et al, 2007b). Se asume así que, en este caso, se daría la oligomerización LRP5/6 con Fz, que reclutaría a DVL, transduciéndose así la señal (Bryja et al, 2007b; Cong et al, 2003).

Por otro lado, DVL se ha relacionado con las vías no canónicas de Wnt como punto en el que divergen las diferentes cascadas (Yan et al, 2001). La interacción de DVL1 y DVL2 fosforilados con β -arrestina 1 supone un punto de regulación sobre las proteínas DVL (Chen et al, 2001). β -Arrestina 1 es una proteína relacionada con la desensibilización e internalización de GPCR (*G-Protein Coupled Receptor*). La expresión conjunta de β -arrestina 1 y DVL2 potencia la actividad LEF (Chen et al, 2001). En un trabajo posterior (Chen et al, 2003) se corrobora que el complejo β -arrestina 2, DVL2 y

Fz4, en presencia del estímulo Wnt5a, inicia la internalización del receptor. La internalización del receptor normalmente se relaciona con una terminación de la señal a largo plazo; sin embargo, existen evidencias de que la endocitosis de las proteínas WNT junto con los receptores, sirve para promover la propia señalización, al menos en primera instancia. La inhibición de expresión de clatrina tuvo como respuesta un descenso en la actividad en el ensayo TOPFLASH en células de ratón (Blitzer and Nusse 2006). Sin embargo, también se ha descrito que DVL pierde su expresión en respuesta a la inhibición de la endocitosis de los receptores FZ, inhibiéndose de esta forma la señal WNT. Por otro lado, dicha señal también se inhibe, cuando la maquinaria endocítica está en funcionamiento, pero no está presente DVL, por un incremento en su degradación (Bryja et al, 2007a). Es decir, DVL sería un elemento fundamental en la regulación de la señal.

Los niveles de ARNm obtenidos en los tumores investigados en nuestro estudio, muestran niveles de expresión similares a los detectados en tejido de colon control en tumores MSI-H, y pérdida de expresión en tumores MSI-L/MSS. El papel más ampliamente descrito para DVL es el de regulador positivo de la cascada WNT, aunque existen funciones, como su implicación en la internalización del receptor Fz, que podrían llevar a hipotetizar con una función negativa en cuanto a la regulación de la señal. La pérdida de *DVL2*, por tanto, no explicaría el pronóstico más desfavorable observado en los pacientes que desarrollan tumores colorrectales estables para microsatélites. De hecho, nuestros experimentos *in vitro* indican que *DVL2* actúa como un regulador positivo de la señal WNT. El silenciamiento de *DVL2* en la línea celular RKO, con posterior estimulación de la vía mediante WNT3a humana recombinante, originó un descenso de la señal esperada. Así este resultado estaría en concordancia con los expuestos por Bryja et al, que demuestran que DVL2 ejerce una regulación positiva en la cascada de señalización cuando se trabaja a tiempos largos y concentraciones elevadas de estímulo (Bryja et al, 2007b). Sin embargo, también se ha observado que la pérdida o sobre-expresión de DVL2 influye en menor medida en la respuesta Wnt/TCF, en comparación con cambios en los otros dos componentes de la familia DVL1 y DVL3 (Lee et al, 2008). No obstante, se ha descrito a DVL2 como objeto de un mecanismo de retroalimentación negativa en respuesta a una mayor activación

de la vía WNT por inhibición de la endocitosis de los receptores Fz (Bryja et al, 2007a). Es por ello, que nuestros tumores MSI-L/MSS que parecen tener una mayor activación de la vía, estén desarrollando este mecanismo de regulación negativa sobre DVL2, silenciando su expresión. Por otro lado, nuestros resultados también indican que la expresión de *DVL2* es mayor en tumores colorrectales MSI-L/MSS de tamaño T3 ($P = 0,056$), lo que atendiendo a su función como regulador de la vía, estaría favoreciendo la activación WNT en estos tumores de mayor tamaño.

1.6 Kremen 2

Kremen 2 (Krm2) es una proteína transmembrana de la misma familia que Kremen1. En nuestros resultados, *Kremen 2* muestra una regulación a la baja en tumores MSI-L/MSS en comparación con tumores MSI-H. Los ligandos que se han descrito para estas proteínas transmembrana son las proteínas Dkk (Dickkopf), de las que se conocen cuatro representantes: Dkk1, Dkk2, Dkk3 y Dkk4. Dkk1 y Dkk2 son capaces de unirse a Krm2 y Krm1, produciéndose dicha unión de forma directa (Mao et al, 2002). También se ha comprobado que Dkk3 no se une a Krm2 (Mao and Niehrs, 2003). Su función en la regulación de la vía WNT se focaliza a nivel del correceptor LRP6, al que se ha demostrado que es capaz de unirse (Hassler et al, 2007). En un principio, se consideró que su papel era de regulador negativo de la activación de la cascada. Su expresión en células humanas de riñón 293T no provoca la inhibición de la respuesta al ensayo TOPFLASH, únicamente cuando se expresa de forma concomitante a Dkk1 (*Dickkopf 1*). No obstante, la inhibición de Krm2 y Krm1 demuestra que son necesarios para la inhibición en dicho ensayo TOPFLASH (Mao et al, 2002). En este trabajo, los autores muestran que, por sí sola, la expresión de Krm2 no provoca ningún efecto. De hecho, la expresión de LRP6 y Dkk2 en células 293T induce respuesta en el ensayo TOPFLASH, inhibiéndose únicamente en presencia de Krm2 (Mao and Niehrs, 2003). También se ha observado que la co-expresión de Krm2/Dkk1/Wnt8/LRP6 en *Xenopus* inhibe la señal WNT. Sin embargo, en la misma situación en ausencia de Krm2, Dkk1 no es capaz de reproducir el mismo efecto inhibitorio. Por tanto, Krm2 sería el factor limitante para conseguir el efecto inhibitorio (Davidson et al, 2002). Se sabe, además, que la formación del complejo Dkk1, Krm2 y LRP6 provoca la

internalización del mismo en vesículas, lo cual podría provocar una degradación del receptor (Mao et al, 2002). El hecho de que además LRP5/6 sean capaces de unirse a axina, expone la posibilidad de que la internalización afectase también a ésta última y, con ello, favoreciese la inestabilidad del complejo de degradación de β -catenina (Rothbächer and Lemaire, 2002).

Existen trabajos, sin embargo, en los que se demuestra un papel dual para Krm2. Así, transfecciones de *XKrm1* y *XKrm2* con LRP6 en *Xenopus*, sin la presencia de Dkk1, estimulan la señalización WNT (Hassler et al, 2007). Por tanto, los Krms, en ausencia de Dkk, serían capaces de activar la vía a través de la señalización por LRP6. A su vez, en ese mismo trabajo, transfecciones de *WNT/Fz* o *WNT/Fz/LRP6* con *Krm1/2* en la línea celular HEK293T, no afectaron a la señalización WNT. Ante estos resultados, los autores del estudio concluyen que la regulación de las proteínas Krms depende del entorno celular. El mecanismo de actuación que proponen es que, dada la capacidad de unión de Krm2 a LRP6, promueve su localización en la membrana celular, actuando Krm2 como una chaperona para LRP6 (Hassler et al, 2007). La presencia de Dkk1 induciría la internalización del complejo (Mao et al, 2002).

Los datos de expresión de *Kremen 2* que se derivan del análisis de la población de tumores objeto de estudio en esta Tesis, muestran unos mayores niveles del ARNm en tumores MSI-H frente a tumores MSI-L/MSS, con diferencias estadísticamente significativas. Atendiendo a los datos de la bibliografía y, considerando la función como regulador negativo de *Kremen 2* en la vía, el descenso de expresión de dicho gen podría explicar una mayor señal de activación en los tumores estables para microsatélites. La otra proteína de la familia, *Kremen 1*, ha sido descrita como supresora de la vía WNT en líneas celulares diferenciadas (Nakamura et al, 2007). En este trabajo, se plantea que la pérdida de expresión de *Krm* proveería a las células de un mecanismo para escapar al cribado de activación que constituye la asociación Dkk-Krm, adquiriendo dichas células una activación de la cascada WNT constitutiva. Dkk2 en presencia de LRP6, actúa como activador de la señal (Mao and Niehrs, 2003). Aunque Dkk2 puede actuar como activador de la vía en *Xenopus*, también puede actuar como

inhibidor en las células HEK293T (Wu et al, 2000). De hecho, Kremen 2 actúa como factor diferencial que induce activación o inhibición de la señal.

1.7 WNT Inhibitor Factor 1

WIF1 (*WNT Inhibitor Factor 1*) también mostró diferencias significativas de expresión entre los tumores colorrectales MSI-H y MSI-L/MSS que se investigan. Representa un tipo de inhibidor extracelular de la vía con capacidad de unión directa a las proteínas WNT de forma no covalente. La sobre-expresión de la proteína humana *WIF1* en *Xenopus* produce un fenotipo similar al que se genera con el dominante negativo de X-WNT-8 (Hsieh et al, 1999). Por otro lado, la pérdida de expresión en la línea celular tumoral de vejiga T24 induce niveles altos de *ciclina D1* y *c-myc* (Urakami et al, 2006). En líneas generales, este gen aparece regulado a la baja en tipos tumorales como próstata, mama, pulmón, vejiga y colon, así como en líneas celulares de cáncer de colon, pulmón, vejiga (Urakami et al, 2006; He et al, 2005; Taniguchi et al, 2005; Mazieres et al, 2004; Wissman et al, 2003). En todos los casos se encontró correspondencia entre esta baja expresión y altos niveles de hipermetilación del promotor. De hecho, el promotor tiene un alto porcentaje de secuencias CG (Reguart et al, 2004) con 105 islas CpG (Mazieres et al, 2004). Además de su regulación por hipermetilación del promotor, parece ser que *WIF1* está relacionado con los niveles citosólicos de β -catenina, por lo que la propia vía WNT podría controlar su expresión (Reguart et al, 2004).

Los datos encontrados en nuestra población tumoral, muestran mayores niveles de expresión en cánceres colorrectales estables para microsatélites. El hecho de que los tumores MSI-L/MSS tengan mayor cantidad de ARNm del inhibidor *WIF1* no explicaría una mayor activación de la vía en estos tumores, sino lo contrario. No obstante, y teniendo en cuenta las diferentes aberraciones que pueden detectarse en los distintos puntos de la vía WNT respecto al orden en la cascada de activación, mayores niveles de *WIF1* en los tumores que, en principio, confieren peor pronóstico podrían entenderse como un mecanismo de retroalimentación negativo de la propia

vía, principalmente todo cuando WIF1 está regulado a su vez por la vía WNT (Reguart et al, 2004).

2. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS CON MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR Y MATRIZ EXTRACELULAR EN TUMORES COLORRECTALES MSI-H Y MSI-L/MSS

El estudio relativo a moléculas relacionadas con adhesión celular y matriz extracelular llevado a cabo en esta Tesis, reveló diferencias significativas en cánceres colorrectales esporádicos con y sin inestabilidad en microsatélites, en los niveles de expresión génica de sarcoglicano ϵ y de la metaloproteasa 7.

2.1 Sarcoglicano ϵ

SGCE es la isoforma ϵ de la familia de los sarcoglicanos. Las mutaciones en este gen se han relacionado principalmente con el síndrome de la mioclonía-distonía, una enfermedad hereditaria que provoca alteraciones en los movimientos (Nardocci et al, 2008). Los niveles de ARNm para *SGCE* que encontramos en nuestra población tumoral muestran una expresión menor en tumores MSI-H frente a tumores MSI-L/MSS. Sin embargo, su relación con cáncer no está muy estudiada. Existe un trabajo en el que se analiza la expresión de este gen en hepatocarcinoma humano (Dong et al, 2009). En dicho ensayo, se observa una mayor expresión de *SGCE* en tumores frente a las muestras no tumorales hepáticas. También se ha observado que *SGCE* muestra una elevada expresión en células B en pacientes con leucemia linfocítica crónica (Kainz et al, 2007). *SGCE* se expresa, asimismo, junto con el resto del complejo sarcoglicano en células del músculo liso (Straub et al, 1999).

Nuestros resultados en tumores colorrectales con y sin inestabilidad en microsatélites, muestran mayor expresión de *SGCE* en tumores MSI-L/MSS. Dado que los estudios publicados hasta la fecha son meramente descriptivos, y ninguno especifica la función que desempeñaría *SGCE* en el desarrollo del tumor, es difícil

afirmar una conclusión frente a este resultado. SGCE podría ser un marcador tumoral sin más implicación funcional. En cualquier caso, serían necesarios más estudios.

2.2 Metaloproteasa de matriz extracelular 7

MMP-7 (Matrix MetalloProteinase 7) pertenece a la familia de metaloproteasas de matriz extracelular. Dichas enzimas están involucradas en multitud de procesos fisiológicos de homeostasis de la matriz extracelular, y se ven alteradas en procesos patológicos como el cáncer o la artritis. *MMP-7* está relacionado con la vía WNT al ser uno de los genes diana de la misma. Posee una región de unión a TCF-4 en su promotor (Brabletz et al, 1999). La enzima se ha encontrado sobre-expresada en cánceres colorrectales (Fang et al, 2009; Kirmlioglu et al, 2006; Luo et al, 2005). En concreto, se expresa en mayor medida en tumores en estadios avanzados, estadios de C y D en cáncer colorrectal, y se ha comprobado su implicación en invasión, metástasis hepáticas e infiltración de módulos linfáticos. (Fang et al, 2009; Luo et al, 2005; Ougolkov et al, 2002; Brabletz et al, 1999). Se ha detectado, además, una correlación positiva entre la presencia de β -catenina y *MMP-7* en el frente invasivo de tumores de colon (Ougolkov et al, 2002).

Los resultados obtenidos a partir de nuestra población de tumores concuerdan con la bibliografía previa, en términos de elevada expresión en cánceres colorrectales. En primer lugar, la diferencia significativa de expresión de *MMP-7* entre los estadios A y D en los tumores estables para microsatélites, confirma los datos recogidos en trabajos anteriores en relación a la mayor expresión de esta metaloproteasa en estadios avanzados. Además, también hemos podido corroborar una mayor cantidad de ARNm de *MMP-7* en tumores MSS/MSI-L, en relación con metástasis. (Fang et al, 2009; Luo et al, 2005; Ougolkov et al.)

Nuestros datos muestran, además, una mayor expresión de *MMP-7* en tumores estables para microsatélites en comparación con aquellos en los que se detecta alta inestabilidad. Este hecho vendría a corroborar los datos obtenidos por nuestro grupo, que demuestran que *ciclina D1*, otro de los genes diana de la vía WNT, aparece sobre-

expresado en tumores MSI-L/MSS (Ortega et al, 2008). La diferencia de expresión de *MMP-7* entre los dos tipos tumorales objeto de estudio no viene dada por afectación del promotor, al menos en lo que respecta a las secuencias microsatélite descritas en el mismo. Los resultados del estudio de secuenciación de las repeticiones mononucleotídicas A₇ y A₉ del promotor, no mostraron alteración alguna en las muestras MSI-H investigadas. Así, nuestros resultados también indican cómo la expresión de *MMP-7* está relacionada con el estadio avanzados de Dukes D (P = 0,042) y con la presencia de metástasis a distancia (P = 0,047). Se ha observado en epitelios dañados por diferentes enfermedades pulmonares, que *MMP-7* media la ruptura del ectodominio de E-cadherina (McGuire et al, 2003). Estos autores, además, proponen que esa ruptura de E-cadherina provocaría un incremento en los niveles de β -catenina, que podría pasar al núcleo y alterar la expresión génica. Publicaciones de nuestro grupo confirman dicha suposición, dado que hemos podido observar un mayor truncamiento de E-cadherina en tumores MSS/MSI-L acompañado de un incremento significativo de β -catenina nuclear (Ortega et al, 2008). En concordancia con este resultado, se ha publicado también que *MMP-7* es capaz de degradar VE-cadherina en células endoteliales umbilicales humanas (Ichikawa et al, 2006). Este hecho, además, incrementó la cantidad de β -catenina nuclear y la expresión de *COX-2*, cuyo promotor posee sitios de unión a TCF-4.

CONCLUSIONES

Las conclusiones principales de esta Tesis son las siguientes:

1. Los tumores colorrectales esporádicos con y sin inestabilidad en microsatélites presentan un perfil diferente de expresión *in vivo* de genes relacionados con la vía WNT. Los genes *PPP2R1B*, *CSNK1D*, *DVL2*, *FBXW4*, *TLE3*, *KREMEN2* poseen niveles de expresión en tumores clasificados como MSI-H similares a los detectados en tejido control, siendo dicha expresión significativamente menor en tumores MSI-L/MSS. Por el contrario, el gen *WIF1* tiene una expresión menor en los tumores MSI-H frente a tumores MSI-L/MSS.

2. Los genes *SGCE* y *MMP-7* presentan una expresión significativamente mayor en tumores colorrectales esporádicos MSI-L/MSS frente a tumores MSI-H. La expresión incrementada de *MMP-7* en cánceres de la vía supresora se relaciona con el estadio tumoral, detectándose mayores niveles de expresión en los tumores MSI-L/MSS clasificados en el estadio D de Dukes.

3. Los ensayos realizados en relación con el gen *FBXW4* y la actividad transcripcional de TCF-4 en líneas celulares con inestabilidad en microsatélites, confirman el papel del mismo como regulador negativo de la vía. La pérdida de expresión de este gen observada *in vivo* en tumores MSI-L/MSS podría contribuir a explicar una mayor activación de la cascada WNT en los cánceres colorrectales de la vía supresora.

4. Los ensayos realizados en relación con los genes *PPP2R1B* y *DVL2* y la actividad transcripcional de TCF-4 en líneas celulares de cáncer de colon con inestabilidad en microsatélites, indican que ambos genes actúan como reguladores positivos de la vía WNT.

CONCLUSIÓN FINAL: El estudio de expresión diferencial de la vía WNT y de moléculas de adhesión y matriz extracelular en cáncer colorrectal con y sin inestabilidad en microsatélites, permite concluir que existe una mayor activación de la vía WNT y una mayor expresión del gen diana *MMP-7* en tumores estables o con baja inestabilidad, con respecto al grupo de alta inestabilidad. Estos datos sugieren una menor invasividad de los cánceres con alta inestabilidad, lo cual se correspondería con el pronóstico clínico más favorable que confiere este tipo tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

A

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. *beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J. 1997 Jul 1;16(13):3797-804*

Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, García JM, Muñoz A, Esteller M, González-Sancho JM. *Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. Oncogene. 2006 Jul 6;25(29):4116-21. Epub 2006 Feb 20*

Ahmed N, Niu J, Dorahy DJ, Gu X, Andrews S, Meldrum CJ, Scott RJ, Baker MS, Macreadie IG, Agrez MV. *Direct integrin alphavbeta6-ERK binding: implications for tumour growth. Oncogene. 2002 Feb 21;21(9):1370-80.*

Akhoondi S, Sun D, von der Lehr N, Apostolidou S, Klotz K, Maljukova A, Cepeda D, Fiegl H, Dafou D, Marth C, Mueller-Holzner E, Corcoran M, Dagnell M, Nejad SZ, Nayer BN, Zali MR, Hansson J, Egyhazi S, Petersson F, Sangfelt P, Nordgren H, Grander D, Reed SI, Widschwendter M, Sangfelt O, Spruck C. *FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. Cancer Res. 2007 Oct 1;67(19):9006-12.*

van Amerongen R, Mikels A, Nusse R. *Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. Sci Signal. 2008 Sep 2;1(35):re9*

Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I. *Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. Genes Dev. 2002 May 1;16(9):1066-76*

Aoki K, Taketo MM. *Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. J Cell Sci. 2007 Oct 1;120(Pt 19):3327-35.*

Arce L, Pate KT, Waterman ML. *Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. BMC Cancer. 2009 May 21;9(1):159. [Epub ahead of print]*

Arroyo JD, Hahn WC. *Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. Oncogene. 2005 Nov 21;24(52):7746-55.*

Axelrod JD. *Strabismus comes into focus*. *Nat Cell Biol*. 2002 Jan;4(1):E6-8.

B

Barker N, Hurlstone A, Musisi H, Miles A, Bienz M, Clevers H. *The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation*. *EMBO J*. 2001 Sep 3;20(17):4935-43

Barozzi C, Ravaioli M, D'Errico A, Grazi GL, Poggioli G, Cavrini G, Mazziotti A, Grigioni WF. *Relevance of biologic markers in colorectal carcinoma: a comparative study of a broad panel*. *Cancer*. 2002 Feb 1;94(3):647-57.

Batsché E, Muchardt C, Behrens J, Hurst HC, Crémisi C. *RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2*. *Mol Cell Biol*. 1998 Jul;18(7):3647-58

Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. *Nature*. 1996 Aug 15;382(6592):638-42.

Behrens J, Lustig B. *The Wnt connection to tumorigenesis*. *Int J Dev Biol*. 2004;48(5-6):477-87.

Benatti P, Gafà R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, Maestri I, Guerzoni L, Roncucci L, Menigatti M, Roncari B, Maffei S, Rossi G, Ponti G, Santini A, Losi L, Di Gregorio C, Olini C, Ponz de Leon M, Lanza G. *Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis*. *Clin Cancer Res*. 2005 Dec 1;11(23):8332-40

Bérout C, Soussi T. *APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines*. *Nucleic Acids Res*. 1996 Jan 1;24(1):121-4.

Bienz M, Clevers H. *Linking colorectal cancer to Wnt signaling*. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):311-20.
Review

Biondi ML, Turri O, Leviti S, Seminati R, Cecchini F, Bernini M, Ghilardi G, Guagnellini E. *MMP1 and MMP3 polymorphisms in promoter regions and cancer. Clin Chem.* 2000 Dec;46(12):2023-4.

Blin N, Stafford DW. *A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acids Res.* 1976 Sep;3(9):2303-8. PubMed PMID: 987581; PubMed Central PMCID: PMC343085

Blitzer JT, Nusse R. *A critical role for endocytosis in Wnt signaling. BMC Cell Biol.* 2006 Jul 6;7:28.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. *A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5248-57.

Bos CL, Kodach LL, van den Brink GR, Diks SH, van Santen MM, Richel DJ, Peppelenbosch MP, Hardwick JC. *Effect of aspirin on the Wnt/beta-catenin pathway is mediated via protein phosphatase 2A. Oncogene.* 2006 Oct 19;25(49):6447-56. Epub 2006 Jul 31.

Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T *beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. Am J Pathol.* 1999 Oct;155(4):1033-8

Bryja V, Cajánek L, Grahn A, Schulte G. *Inhibition of endocytosis blocks Wnt signalling to beta-catenin by promoting dishevelled degradation. Acta Physiol (Oxf).* 2007a May;190(1):55-61.

Bryja V, Schulte G, Arenas E. *Wnt-3a utilizes a novel low dose and rapid pathway that does not require casein kinase 1-mediated phosphorylation of Dvl to activate beta-catenin. Cell Signal.* 2007b Mar;19(3):610-6.

Bryja V, Schulte G, Rawal N, Grahn A, Arenas E. *Wnt-5a induces Dishevelled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1-dependent mechanism. J Cell Sci.* 2007c Feb 15;120(Pt 4):586-95.

C

Calin GA, di Iasio MG, Caprini E, Vorechovsky I, Natali PG, Sozzi G, Croce CM, Barbanti-Brodano G, Russo G, Negrini M. Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and beta (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms. *Oncogene*. 2000 Feb 24;19(9):1191-5.

Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A. *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*. 1998 Oct 8;395(6702):604-8.

de la Chapelle A, Microsatellite instability. *N Engl J Med*. 2003 Jul 17;349(3):209-10

Chen G, Courey AJ. Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene*. 2000 May 16;249(1-2):1-16.

Chen G, Nguyen PH, Courey AJ. A role for Groucho tetramerization in transcriptional repression. *Mol Cell Biol*. 1998 Dec;18(12):7259-68.

Chen M, Philipp M, Wang J, Premont RT, Garrison TR, Caron MG, Lefkowitz RJ, Chen W. G protein-coupled receptor kinases phosphorylate LRP6 in the Wnt pathway. *J Biol Chem*. 2009 Oct 2.

Chen W, Possemato R, Campbell KT, Plattner CA, Pallas DC, Hahn WC. Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell*. 2004 Feb;5(2):127-36

Chen W, ten Berge D, Brown J, Ahn S, Hu LA, Miller WE, Caron MG, Barak LS, Nusse R, Lefkowitz RJ. Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science*. 2003 Sep 5;301(5638):1391-4.

Chen W, Hu LA, Semenov MV, Yanagawa S, Kikuchi A, Lefkowitz RJ, Miller WE. beta-Arrestin1 modulates lymphoid enhancer factor transcriptional activity through interaction with phosphorylated dishevelled proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 18;98(26):14889-94. Epub 2001 Dec 11.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9. PubMed PMID: 2440339

Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* 2003 Nov 15;193(1-2):3-34

Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med.* 2003 Apr 1;138(7):560-70.

Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR. Cigarette smoking and colorectal carcinoma mortality in a cohort with long-term follow-up *Cancer.* 2004 Jan 15;100(2):288-93

Cong F, Varmus H. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):2882-7. Epub 2004 Feb 23

Cook D, Fry MJ, Hughes K, Sumathipala R, Woodgett JR, Dale TC. Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *EMBO J.* 1996 Sep 2;15(17):4526-36

da Costa LT, He TC, Yu J, Sparks AB, Morin PJ, Polyak K, Laken S, Vogelstein B, Kinzler KW. CDX2 is mutated in a colorectal cancer with normal APC/beta-catenin signaling. *Oncogene.* 1999

Coyle Y.M. *Lifestyle, Genes and Cancer Methods of Molecular Biology, Cancer Epidemiology,* vol. 472 2009

Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1998 Aug 1;58(15):3455-60.

D

Dann CE, Hsieh JC, Rattner A, Sharma D, Nathans J, Leahy DJ. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature.* 2001 Jul 5;412(6842):86-90

Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol.* 2005 Apr;12(4):364-71. Epub 2005 Mar 13.

Davidson G, Mao B, del Barco Barrantes I, Niehrs C. Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning. *Development.* 2002 Dec;129(24):5587-96.

Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stanek P, Glinka A, Niehrs C. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature.* 2005 Dec 8;438(7069):867-72.

Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, Truta B, Sleisenger MH, Kim YS. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):191-5

Ding VW, Chen RH, McCormick F. Differential regulation of glycogen synthase kinase 3beta by insulin and Wnt signaling. *J Biol Chem.* 2000 Oct 20;275(42):32475-81

Dionigi G, Bianchi V, Villa F, Rovera F, Boni L, Annoni M, Castano P, Dionigi R. Differences between familial and sporadic forms of colorectal cancer with DNA microsatellite instability. *Surg Oncol.* 2007 Dec;16 Suppl 1:S37-42. Epub 2007 Nov 26.

Dong H, Ge X, Shen Y, Chen L, Kong Y, Zhang H, Man X, Tang L, Yuan H, Wang H, Zhao G, Jin W. Gene expression profile analysis of human hepatocellular carcinoma using SAGE and LongSAGE. *BMC Med Genomics.* 2009 Jan 26;2:5.

Du SJ, Purcell SM, Christian JL, McGrew LL, Moon RT. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol.* 1995 May;15(5):2625-34

Dumin JA, Dickeson SK, Stricker TP, Bhattacharyya-Pakrasi M, Roby JD, Santoro SA, Parks WC. Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release

from keratinocytes migrating on type I collagen. J Biol Chem. 2001 Aug 3;276(31):29368-74. Epub 2001 May 18.

Duval A, Iacopetta B, Ranzani GN, Lothe RA, Thomas G, Hamelin R. Variable mutation frequencies in coding repeats of TCF-4 and other target genes in colon, gastric and endometrial carcinoma showing microsatellite instability. Oncogene.1999 Nov 18;18(48):6806-9

Duval A, Rolland S, Compoint A, Tubacher E, Iacopetta B, Thomas G, Hamelin R. Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. Hum Mol Genet. 2001 Mar 1;10(5):513-8

E

Egger-Adam D, Katanaev VL. The trimeric G protein Go inflicts a double impact on axin in the Wnt/frizzled signaling pathway. Dev Dyn. 2009 Aug 24. [Epub ahead of print]

Eichhorn PJ, Creighton MP, Bernards R Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. Biochim Biophys Acta. 2009 Jan;1795(1):1-15. Epub 2008 Jun 3.

Ekbom A, Helmick C, Zack M, and Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. Lancet 336, 357 – 359. 1990

Eleftheriou A, Yoshida M, Henderson BR. Nuclear export of human beta-catenin can occur independent of CRM1 and the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. J Biol Chem. 2001 Jul 13;276(28):25883-8. Epub 2001 May 3.

Everman DB, Morgan CT, Lyle R, Laughridge ME, Bamshad MJ, Clarkson KB, Colby R, Gurrieri F, Innes AM, Roberson J, Schrandt-Stumpel C, van Bokhoven H, Antonarakis SE, Schwartz CE. Frequency of genomic rearrangements involving the SHFM3 locus at chromosome 10q24 in syndromic and non-syndromic split-hand/foot malformation. Am J Med Genet A. 2006 Jul 1;140(13):1375-83.

F

Fang YJ, Lu ZH, Wang GQ, Pan ZZ, Zhou ZW, Yun JP, Zhang MF, Wan DS. Elevated expressions of MMP7, TROP2, and survivin are associated with survival, disease recurrence, and liver metastasis of colon cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2009 May 7.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67

Ferlay J., P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet & P. Boyle. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006 International Agency for Research on Cancer, *Annals of Oncology* 18: 581–592, 2007

Fish KJ, Cegielska A, Getman ME, Landes GM, Virshup DM. Isolation and characterization of human casein kinase I epsilon (CKI), a novel member of the CKI gene family. *J Biol Chem*. 1995 Jun 23;270(25):14875-83.

Forde JE, Dale TC. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Aug;64(15):1930-44.

Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 2003 Jun;63(6):1256-72.

Fukumoto S, Hsieh CM, Maemura K, Layne MD, Yet SF, Lee KH, Matsui T, Rosenzweig A, Taylor WG, Rubin JS, Perrella MA, Lee ME. Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled *J Biol Chem*. 2001 May 18;276(20):17479-83. Epub 2001 Mar 9.

Fung YK, Shackelford GM, Brown AM, Sanders GS, Varmus HE. Nucleotide sequence and expression in vitro of cDNA derived from mRNA of int-1, a provirally activated mouse mammary oncogene. *Mol Cell Biol*. 1985 Dec;5(12):3337-44

G

Gayet J, Zhou XP, Duval A, Rolland S, Hoang JM, Cottu P, Hamelin R. Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene*. 2001 Aug 16;20(36):5025-32

Gao ZH, Seeling JM, Hill V, Yochum A, Virshup DM. Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5;99(3):1182-7. Epub 2002 Jan 29.

Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Jun 5;1653(1):1-24

Gomis-Rüth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature*. 1997 Sep 4;389(6646):77-81.

Gong J, Wang D, Sun L, Zborowska E, Willson JK, Brattain MG. Role of alpha 5 beta 1 integrin in determining malignant properties of colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ*. 1997 Jan;8(1):83-90

Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol*. 2001 May 28;153(5):1049-60

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991 Aug 9;66(3):589-600

H

Habas R, Dawid IB. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J Biol*. 2005;4(1):2. Epub 2005 Feb 17

Halford S, Sasieni P, Rowan A, Wasan H, Bodmer W, Talbot I, Hawkins N, Ward R, Tomlinson I. Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait. *Cancer Res.* 2002 Jan 1;62(1):53-7

Haribaskar R, Pütz M, Schupp B, Skouloudaki K, Bietenbeck A, Walz G, Schäfer T. The planar cell polarity (PCP) protein Diversin translocates to the nucleus to interact with the transcription factor AF9. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Sep 11;387(1):212-7. Epub 2009 Jul 8.

Hassler C, Cruciat CM, Huang YL, Kuriyama S, Mayor R, Niehrs C. Kremen is required for neural crest induction in *Xenopus* and promotes LRP6-mediated Wnt signaling. *Development.* 2007 Dec;134(23):4255-63. Epub 2007 Oct 31.

Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, Shiomi T, Matsusaka H, Kubota T, Imanaka-Yoshida K, Itoh T, Takeshita A. Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Sep;285(3):H1229-35. Epub 2003 May 29

He B, Reguart N, You L, Mazieres J, Xu Z, Lee AY, Mikami I, McCormick F, Jablons DM. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene.* 2005 Apr 21;24(18):3054-8.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998 Sep 4;281(5382):1509-12

He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development.* 2004 Apr;131(8):1663-77

Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F, Kemler R. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J.* 2000 Apr 17;19(8):1839-50.

Heinen CD, Richardson D, White R, Groden J. Microsatellite instability in colorectal adenocarcinoma cell lines that have full-length adenomatous polyposis coli protein. *Cancer Res.* 1995 Nov 1;55(21):4797-9

Hemmings BA, Adams-Pearson C, Maurer F, Müller P, Goris J, Merlevede W, Hofsteenge J, Stone SR. α - and β -forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry.* 1990 Apr 3;29(13):3166-73.

Hendrix P, Turowski P, Mayer-Jaekel RE, Goris J, Hofsteenge J, Merlevede W, Hemmings BA. Analysis of subunit isoforms in protein phosphatase 2A holoenzymes from rabbit and *Xenopus*. *J Biol Chem.* 1993 Apr 5;268(10):7330-7

Herzig M, Savarese F, Novatchkova M, Semb H, Christofori G. Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of β -catenin/Tcf-mediated Wnt signaling. *Oncogene.* 2007 Apr 5;26(16):2290-8. Epub 2006 Oct 9

Hino S, Michiue T, Asashima M, Kikuchi A. Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of β -catenin. *J Biol Chem.* 2003 Apr 18;278(16):14066-73. Epub 2003 Jan 28

Hinoda Y, Okayama N, Takano N, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Hazama S, Kitamura Y, Kamatani N, Oka M. Association of functional polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 genes with colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2002 Dec 10;102(5):526-9.

Hope C, Planutis K, Planutiene M, Moyer MP, Johal KS, Woo J, Santoso C, Hanson JA, Holcombe RF. Low concentrations of resveratrol inhibit Wnt signal throughput in colon-derived cells: implications for colon cancer prevention. *Mol Nutr Food Res.* 2008 Jun;52 Suppl 1:S52-61

Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB, Nathans J. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature.* 1999 Apr 1;398(6726):431-6

Hsu W, Zeng L, Costantini F. Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *J Biol Chem*. 1999 Feb 5;274(6):3439-45.

Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*. 1997 Sep 5;90(5):871-82

Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J*. 1993 Feb;12(2):803-8.

Hülsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127(6 Pt 2):2061-9

Hurlstone A, Clevers H. T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J*. 2002 May 15;21(10):2303-11

I

Ilanakiev P, Kilpatrick MW, Dealy C, Kosher R, Korenberg JR, Chen XN, Tsipouras P. A novel human gene encoding an F-box/WD40 containing protein maps in the SHFM3 critical region on 10q24. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jul 22;261(1):64-70.

Ichikawa Y, Ishikawa T, Momiyama N, Kamiyama M, Sakurada H, Matsuyama R, Hasegawa S, Chishima T, Hamaguchi Y, Fujii S, Saito S, Kubota K, Hasegawa S, Ike H, Oki S, Shimada H. Matrilysin (MMP-7) degrades VE-cadherin and accelerates accumulation of beta-catenin in the nucleus of human umbilical vein endothelial cells. *Oncol Rep*. 2006 Feb;15(2):311-5.

Ikeda S, Kishida M, Matsuura Y, Usui H, Kikuchi A. GSK-3beta-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin. *Oncogene*. 2000 Jan 27;19(4):537-45

Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*. 2008 Apr;29(4):673-80. Epub 2007 Oct 17

Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibuya H, Matsumoto K. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*. 1999 Jun 24;399(6738):798-802

Iwao K, Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Kinoshita M, Fukui T, Ishiguro S, Nakamura Y, Miyoshi Y. Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Res*. 1998 Mar 1;58(5):1021-6

Iwatsuki M, Mimori K, Ishii H, Yokobori T, Takatsuno Y, Sato T, Toh H, Onoyama I, Nakayama KI, Baba H, Mori M. Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: Clinical significance. *Int J Cancer*. 2009 Sep 8. [Epub ahead of print]

J

Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*. 2001 Feb 1;353(Pt 3):417-39

Jass JR, Walsh MD, Barker M, Simms LA, Young J, Leggett BA. Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *Eur J Cancer*. 2002 May;38(7):858-66

Jass, JR HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam Cancer*. 2004;3(2):93-100

Jentsch S. Ubiquitin-dependent protein degradation: a cellular perspective. *Trends Cell Biol*. 1992 Apr;2(4):98-103.

Ji BT, Weissfeld JL, Chow WH, Huang WY, Schoen RE, Hayes RB. Tobacco smoking and colorectal hyperplastic and adenomatous polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 May;15(5):897-901.

Jiang P, Enomoto A, Takahashi M. Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton. *Cancer Lett.* 2009 Nov 1;284(2):122-30. Epub 2009 Mar 19. Review

Jormsjö S, Whatling C, Walter DH, Zeiher AM, Hamsten A, Eriksson P. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-7 promoter activity is associated with coronary artery luminal dimensions among hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Nov;21(11):1834-9.

K

Kadowaki T, Shiozaki H, Inoue M, Tamura S, Oka H, Doki Y, Iihara K, Matsui S, Iwazawa T, Nagafuchi A, et al. E-cadherin and alpha-catenin expression in human esophageal cancer. *Cancer Res.* 1994 Jan 1;54(1):291-6

Kainz B, Shehata M, Bilban M, Kienle D, Heintel D, Krömer-Holzinger E, Le T, Kröber A, Heller G, Schwarzingen I, Demirtas D, Chott A, Döhner H, Zöchbauer-Müller S, Fonatsch C, Zielinski C, Stilgenbauer S, Gaiger A, Wagner O, Jäger U. Overexpression of the paternally expressed gene 10 (PEG10) from the imprinted locus on chromosome 7q21 in high-risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer.* 2007 Nov 1;121(9):1984-93.

Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997 Mar 1;57(5):808-11

Kano H, Kurahashi H, Toda T. Genetically regulated epigenetic transcriptional activation of retrotransposon insertion confers mouse dactylaplasia phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov 27;104(48):19034-9. Epub 2007 Nov 5.

Katanaev VL, Ponzielli R, Sémériva M, Tomlinson A. Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in *Drosophila*. *Cell.* 2005 Jan 14;120(1):111-22.

Ki H, Jung HC, Park JH, Kim JS, Lee KY, Kim TS, Kim K. Overexpressed LEF-1 proteins display different nuclear localization patterns of beta-catenin in normal versus tumor cells. *Cell Biol Int*. 2006 Mar;30(3):253-61. Epub 2005 Dec 27

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):159-70.

Kirimlioglu H, Kirimlioglu V, Yilmaz S, Sagir V, Coban S, Turkmen E, Hilmioglu F. Role of matrix metalloproteinase-7 in colorectal adenomas. *Dig Dis Sci*. 2006 Nov;51(11):2068-72. Epub 2006 Sep 29.

Klein TJ, Mlodzik M. Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:155-76.

Knudson G.A. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001 Nov;1(2):157-62.

Koenig A, Mueller C, Hasel C, Adler G, Menke A. Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*. 2006 May 1;66(9):4662-71

Koike M, Kose S, Furuta M, Taniguchi N, Yokoya F, Yoneda Y, Imamoto N. beta-Catenin shows an overlapping sequence requirement but distinct molecular interactions for its bidirectional passage through nuclear pores. *J Biol Chem*. 2004 Aug 6;279(32):34038-47. Epub 2004 Jun 1

Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara SI, Miyakura Y, Nagai H, Mano H. Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability. *Oncogene*. 2006 Jan 5;25(1):139-46

Koretz K, Schlag P, Boumsell L, Möller P. Expression of VLA-alpha 2, VLA-alpha 6, and VLA-beta 1 chains in normal mucosa and adenomas of the colon, and in colon carcinomas and their liver metastases. *Am J Pathol*. 1991 Mar;138(3):741-50.

Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1784-7

Kühl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem*. 2000a Apr 28;275(17):12701-11.

Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet*. 2000b Jul;16(7):279-83

L

Laux H, Tomer R, Mader MT, Smida J, Budczies J, Kappler R, Hahn H, Blöchliger M, Schnitzbauer U, Eckardt-Schupp F, Höfler H, Becker KF Tumor-associated E-cadherin mutations do not induce Wnt target gene expression, but affect E-cadherin repressors. *Lab Invest*. 2004 Oct;84(10):1372-86.

Lee YI, Seo M, Kim Y, Kim SY, Kang UG, Kim YS, Juhnn YS. Membrane depolarization induces the undulating phosphorylation/dephosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta, and this dephosphorylation involves proteinphosphatases 2A and 2B in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 2005 Jun 10;280(23):22044-52. Epub 2005 Mar 30.

Lee YN, Gao Y, Wang HY. Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3. *Cell Signal*. 2008 Feb;20(2):443-52. Epub 2007 Nov 17.

Leeman MF, McKay JA, Murray GI. Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Oct;55(10):758-62.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998 Dec 17;396(6712):643-9.

Leyns L, Bouwmeester T, Kim SH, Piccolo S, De Robertis EM. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell*. 1997 Mar 21;88(6):747-56.

Li L, Yuan H, Weaver CD, Mao J, Farr GH 3rd, Sussman DJ, Jonkers J, Kimelman D, Wu D. Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J.* 1999 Aug 2;18(15):4233-40.

Li X, Yost HJ, Virshup DM, Seeling JM. Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in *Xenopus*. *EMBO J.* 2001 Aug 1;20(15):4122-31.

Lièvre A, Milet J, Carayol J, Le Corre D, Milan C, Pariente A, Nalet B, Lafon J, Faivre J, Bonithon-Kopp C, Olschwang S, Bonaiti-Pellié C, Laurent-Puig P; members of the ANGH group. Genetic polymorphisms of MMP1, MMP3 and MMP7 gene promoter and risk of colorectal adenoma. *BMC Cancer.* 2006 Nov 24;6:270.

Lin O. S Acquired Risk Factors for Colorectal Cancer *Methods of Molecular Biology, Cancer Epidemiology*, vol. 472 2009

Liu C, Kato Y, Zhang Z, Do VM, Yankner BA, He X. beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May 25;96(11):6273-8.

Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell.* 2002 Mar 22;108(6):837-47

Liu T, DeCostanzo AJ, Liu X, Wang Hy, Hallagan S, Moon RT, Malbon CC. G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway. *Science.* 2001 Jun 1;292(5522):1718-22.

Løvåg T, Meling GI, Diep CB, Thorstensen L, Norheim Andersen S, Lothe RA, Rognum TO. APC and CTNNB1 mutations in a large series of sporadic colorectal carcinomas stratified by the microsatellite instability status. *Scand J Gastroenterol.* 2002 Oct;37(10):1184-93.

Lüchtenborg M, Weijenberg MP, Wark PA, Saritas AM, Roemen GM, van Muijen GN, de Bruijne AP, van den Brandt PA, de Goeij AF. Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer.* 2005 Dec 15;5:160.

Luo HZ, Zhou ZG, Yang L, Yu YY, Tian C, Zhou B, Zheng XL, Xia QJ, Li Y, Wang R. Clinicopathologic and prognostic significance of MMP-7 (matrilysin) expression in human rectal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2005 Dec;35(12):739-44. Epub 2005 Nov 28.

Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, Behrens J. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol*. 2002 Feb;22(4):1184-93

M

Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*. 2002 Jun 6;417(6889):664-7. Epub 2002 May 26

Mao B, Niehrs C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene*. 2003 Jan 2;302(1-2):179-83.

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*. 1995 Jun 2;268(5215):1336-8.

Martin KH, Slack JK, Boerner SA, Martin CC, Parsons JT. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1652-3.

Maykel J.A., Hagerman G., Mellgren A.F., Li S.Y., Alavi K., Baxter N.N., Madoff R.D. Crohn's Colitis: The Incidence of Dysplasia and Adenocarcinoma in Surgical Patients. *Diseases of the colon and rectum* 2006

Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, Mikami I, Reguart N, Rosell R, McCormick F, Jablons DM. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res*. 2004 Jul 15;64(14):4717-20

McGuire JK, Li Q, Parks WC. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *Am J Pathol*. 2003 Jun;162(6):1831-43

McManus EJ, Sakamoto K, Armit LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R, Alessi DR. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J*. 2005 Apr 20;24(8):1571-83. Epub 2005 Mar 24.

Mecklin J.P. The implications of genetics in colorectal cancer *Annals of Oncology* 19 (Supplement 5): v87–v90, 2008

Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*. 2006 Apr;4(4):e115. Epub 2006 Apr 4

Miller JR. The Wnts. *Genome Biol*. 2002;3(1): Reviews 3001. Epub 2001 Dec 28

Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri C, Dale D, Holowaty E, Bapat B, Gallinger S, Redston M. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res*. 1999 Jul 15;59(14):3346-51. PubMed PMID: 10416591.

Miyabayashi T, Teo JL, Yamamoto M, McMillan M, Nguyen C, Kahn M. Wnt/beta-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 27;104(13):5668-73. Epub 2007 Mar 19.

Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*. 1992 Jul;1(4):229-33.

Mlodzik M. Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet*. 2002 Nov;18(11):564-71.

de Mollerat XJ, Gurrieri F, Morgan CT, Sangiorgi E, Everman DB, Gaspari P, Amiel J, Bamshad MJ, Lyle R, Blouin JL, Allanson JE, Le Marec B, Wilson M, Braverman NE, Radhakrishna U, Delozier-Blanchet C, Abbott A, Elghouzzi V, Antonarakis S, Stevenson RE, Munnich A, Neri G, Schwartz CE. A genomic rearrangement resulting in a tandem duplication is associated with split hand-split foot malformation 3 (SHFM3) at 10q24. *Hum Mol Genet*. 2003 Aug 15;12(16):1959-71.

Morán A, Iniesta P, de Juan C, González-Quevedo R, Sánchez-Pernaute A, Díaz-Rubio E, Ramón y Cajal S, Torres A, Balibrea JL, Benito M. Stromelysin-1 promoter mutations impair gelatinase B activation in high microsatellite instability sporadic colorectal tumors. *Cancer Res.* 2002 Jul 1;62(13):3855-60.

Morán A, Iniesta P, de Juan C, García-Aranda C, Díaz-López A, Benito M. Impairment of stromelysin-1 transcriptional activity by promoter mutations in high microsatellite instability colorectal tumors. *Cancer Res.* 2005 May 1;65(9):3811-4

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC *Science.* 1997 Mar 21;275(5307):1787-90.

Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 28;92(7):3046-50

Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V Intestinal cancer risk and mortality in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* Dec;105(6):1716-23 1993

Munshi HG, Stack MS. Reciprocal interactions between adhesion receptor signaling and MMP regulation. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Mar;25(1):45-56.

N

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30;274(31):21491-4

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006 Feb 15;69(3):562-73. Epub 2006 Jan 5.

Nakamura T, Nakamura T, Matsumoto K. The functions and possible significance of Kremen as the gatekeeper of Wnt signalling in development and pathology. *J Cell Mol Med.* 2008 Apr;12(2):391-408. Epub 2007 Dec 14.

Nakaya HI, Beckedorff FC, Baldini ML, Fachel AA, Reis EM, Verjovski-Almeida S. *Splice variants of TLE family genes and up-regulation of a TLE3 isoform in prostate tumors. Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Dec 28;364(4):918-23. Epub 2007 Oct 26.

Nardocci N, Zorzi G, Barzaghi C, Zibordi F, Ciano C, Ghezzi D, Garavaglia B. *Myoclonus-dystonia syndrome: clinical presentation, disease course, and genetic features in 11 families. Mov Disord.* 2008 Jan;23(1):28-34.

Näthke IS, Adams CL, Polakis P, Sellin JH, Nelson WJ. *The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. J Cell Biol.* 1996 Jul;134(1):165-79

Neufeld KL, Nix DA, Bogerd H, Kang Y, Beckerle MC, Cullen BR, White RL. *Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Oct 24;97(22):12085-90.

Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P. *Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. Science.* 1991 Aug 9;253(5020):665-9

Noë V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M. *Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. J Cell Sci.* 2001 Jan;114(Pt 1):111-118.

Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, Moon R, Varmus H. *A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. Cell.* 1991 Jan 25;64(2):231

Nusse R. *Wnt signaling and stem cell control. Cell Res.* 2008 May;18(5):523-7. Review. PubMed PMID: 18392048.

O

Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. *Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. J Biol Chem.* 1992 Feb 25; 267(6): 3581-4

Oliveira C, Westra JL, Arango D, Ollikainen M, Domingo E, Ferreira A, Velho S, Niessen R, Lagerstedt K, Alhopuro P, Laiho P, Veiga I, Teixeira MR, Ligtenberg M, Kleibeuker JH, Sijmons RH, Plukker JT, Imai K, Lage P, Hamelin R, Albuquerque C, Schwartz S Jr, Lindblom A, Peltomaki P, Yamamoto H, Aaltonen LA, Seruca R, Hofstra RM. Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Hum Mol Genet.* 2004 Oct 1;13(19):2303-11. Epub 2004 Aug 4

Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci.* 1999 Apr;112 (Pt 8):1237-45.

Ortega P, Morán A, de Juan C, Frías C, Hernández S, López-Asenjo JA, Sánchez-Pernaute A, Torres A, Iniesta P, Benito M. Differential Wnt pathway gene expression and E-cadherin truncation in sporadic colorectal cancers with and without microsatellite instability. *Clin Cancer Res.* 2008 Feb 15;14(4):995-1001.

Osborne LR. Genomic rearrangements in the spotlight. *Nat Genet.* 2008 Jan;40(1):6-7.

Ougolkov AV, Yamashita K, Mai M, Minamoto T. Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer. *Gastroenterology.* 2002 Jan;122(1):60-71.

P

Pallas DC, Shahrik LK, Martin BL, Jaspers S, Miller TB, Brautigan DL, Roberts TM. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell.* 1990 Jan 12;60(1):167-76.

Palombo F, Iaccharino I, Nakajima E, Ikejima M, Shimada T, Jiricny J. hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr Biol.* 1996 Sep 1;6(9):1181-4.

Park M, Moon RT. The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nat Cell Biol.* 2002 Jan;4(1):20-5

Paschos KA, Canovas D, Bird NCThe role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis. *Cell Signal*. 2009 May;21(5):665-74. Epub 2009 Jan 7

Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA. Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers*. 2004;20(4-5):199-206

Peifer M, McEwen DG. The ballet of morphogenesis: unveiling the hidden choreographers. *Cell*. 2002 May 3;109(3):271-4

Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice *Nature*. 2000 Sep 28;407(6803):535-8

Pizzuti A, Amati F, Calabrese G, Mari A, Colosimo A, Silani V, Giardino L, Ratti A, Penso D, Calzà L, Palka G, Scarlato G, Novelli G, Dallapiccola B. cDNA characterization and chromosomal mapping of two human homologues of the *Drosophila* dishevelled polarity gene. *Hum Mol Genet*. 1996 Jul;5(7):953-8

Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Jun 7;1332(3):F127-47

Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2007 Feb;17(1):45-51.

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 1992 Sep 17;359(6392):235-7.

Price MA. CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev*. 2006 Feb 15;20(4):399-410

Pulido HA, Fakruddin MJ, Chatterjee A, Esplin ED, Beleño N, Martinez G, Posso H, Evans GA, Murty VV. Identification of a 6-cM minimal deletion at 11q23.1-23.2 and exclusion of PPP2R1B gene as a deletion target in cervical cancer. *Cancer Res*. 2000 Dec 1;60(23):6677-82.

R

Ramos DM, Dang D, Sadler S. The role of the integrin alpha v beta6 in regulating the epithelial to mesenchymal transition in oral cancer. *Anticancer Res.* 2009 Jan;29(1):125-30

Ratcliffe MJ, Itoh K, Sokol SY. A positive role for the PP2A catalytic subunit in Wnt signal transduction. *J Biol Chem.* 2000 Nov 17;275(46):35680-3.

Reguart N, He B, Xu Z, You L, Lee AY, Mazieres J, Mikami I, Batra S, Rosell R, McCormick F, Jablons DM. Cloning and characterization of the promoter of human Wnt inhibitory factor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Oct 8;323(1):229-34.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med.* 2003 Jul 17;349(3):247-57.

Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell.* 1987 Aug 14;50(4):649-57.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Dec 3;89(23):1758-62

Romanic AM, Harrison SM, Bao W, Burns-Kurtis CL, Pickering S, Gu J, Grau E, Mao J, Sathe GM, Ohlstein EH, Yue TL. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovasc Res.* 2002 Jun;54(3):549-58.

Rosin-Arbesfeld R, Townsley F, Bienz M. The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature.* 2000 Aug 31;406(6799):1009-12

Rosin-Arbesfeld R, Cliffe A, Brabletz T, Bienz M. Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. *EMBO J.* 2003 Mar 3;22(5):1101-13

Rothbächer U, Lemaire P. Crème de la Kremen of Wnt signalling inhibition. *Nat Cell Biol.* 2002 Jul;4(7):E172-3

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Müller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science.* 1993 Dec 10;262(5140):1731-4

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S, Polakis P. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem.* 1995 Mar 10;270(10):5549-55.

Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science.* 1996 May 17;272(5264):1023-6.

Rubinfeld B, Tice DA, Polakis P. Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1epsilon. *J Biol Chem.* 2001 Oct 19;276(42):39037-45. Epub 2001 Aug 3.

Ruediger R, Pham HT, Walter G. Alterations in protein phosphatase 2A subunit interaction in human carcinomas of the lung and colon with mutations in the A beta subunit gene. *Oncogene.* 2001 Apr 5;20(15):1892-9

Rutz S, Scheffold A. Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(2):78-85. Epub 2004 Mar 10.

S

Sablina AA, Chen W, Arroyo JD, Corral L, Hector M, Bulmer SE, DeCaprio JA, Hahn WC. The tumor suppressor PP2A Abeta regulates the RalA GTPase. *Cell.* 2007 Jun 1;129(5):969-82

Salovaara R, Loukola A, Kristo P, Kääriäinen H, Ahtola H, Eskelinen M, Härkönen N, Julkunen R, Kangas E, Ojala S, Tulikoura J, Valkamo E, Järvinen H, Mecklin JP, Aaltonen LA, de la Chapelle A. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer *J Clin Oncol.* 2000 Jun;18(11):2193-200

Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, Slattery ML. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Sep;10(9):917-23.

Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, Mikoshiba K. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature.* 2002 May 16;417(6886):295-9

Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, Takagi H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M, Sonoda T, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis.* 2007 Dec;28(12):2459-66. Epub 2007 Aug 3

Schwarz-Romond T, Metcalfe C, Bienz M. Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci.* 2007 Jul 15;120(Pt 14):2402-12.

Segditsas S, Rowan AJ, Howarth K, Jones A, Leedham S, Wright NA, Gorman P, Chambers W, Domingo E, Roylance RR, Sawyer EJ, Sieber OM, Tomlinson IP. APC and the three-hit hypothesis. *Oncogene.* 2009 Jan 8;28(1):146-55. Epub 2008 Oct 6

Semënov MV, Snyder M. Human dishevelled genes constitute a DHR-containing multigene family. *Genomics.* 1997 Jun 1;42(2):302-10.

Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol.* 1999 Jul 1;9(13):695-8

Shimizu Y, Ikeda S, Fujimori M, Kodama S, Nakahara M, Okajima M, Asahara T. Frequent alterations in the Wnt signaling pathway in colorectal cancer with microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002 Jan;33(1):73-81

Sierra J, Yoshida T, Joazeiro CA, Jones KA. The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev.* 2006 Mar 1;20(5):586-600.

Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB, Moon RT. Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev Biol.* 1997 Feb 1;182(1):114-20.

Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 9;99(14):9433-8. Epub 2002 Jul 1

Söreide K, Janssen EA, Söiland H, Körner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg*. 2006 Apr;93(4):395-406. Review.

Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Mar 15;58(6):1130-4

Stemmer V, de Craene B, Berx G, Behrens J. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin. *Oncogene*. 2008 Aug 28;27(37):5075-80. Epub 2008 May 12.

Stifani S, Blaumueller CM, Redhead NJ, Hill RE, Artavanis-Tsakonas S. Human homologs of a *Drosophila* Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins. *Nat Genet*. 1992 Oct;2(2):119-27.

Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes JR, Campbell KP. epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem*. 1999 Sep 24;274(39):27989-96.

Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem*. 1990 Oct 15;265(29):17401-4

Suh EK, Gumbiner BM. Translocation of beta-catenin into the nucleus independent of interactions with FG-rich nucleoporins. *Exp Cell Res*. 2003 Nov 1;290(2):447-56.

Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*. 1993 Dec 10;262(5140):1734-7

Sunami E, Tsuno N, Osada T, Saito S, Kitayama J, Tomozawa S, Tsuruo T, Shibata Y, Muto T, Nagawa H. MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *Oncologist*. 2000;5(2):108-14

Suzuki K, Takahashi K. Induction of E-cadherin endocytosis by loss of protein phosphatase 2A expression in human breast cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Oct 13;349(1):255-60. Epub 2006 Aug 15.

Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2004 Apr;36(4):417-22

Swiatek W, Kang H, Garcia BA, Shabanowitz J, Coombs GS, Hunt DF, Virshup DM. Negative regulation of LRP6 function by casein kinase I epsilon phosphorylation. *J Biol Chem*. 2006 May 5;281(18):12233-41. Epub 2006 Mar 2.

T

Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, Takao T, Takada S. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell*. 2006 Dec;11(6):791-801

Takagi Y, Futamura M, Yamaguchi K, Aoki S, Takahashi T, Saji S. Alterations of the PPP2R1B gene located at 11q23 in human colorectal cancers. *Gut*. 2000 Aug;47(2):268-71.

Takahashi K, Nakajima E, Suzuki K. Involvement of protein phosphatase 2A in the maintenance of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion through recruitment of IQGAP1. *J Cell Physiol*. 2006 Mar;206(3):814-20

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991 Mar 22;251(5000):1451-5.

Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y, Furukawa Y. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene*. 2002 Aug 29;21(38):5861-7.

Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell*. 2004 Jan 16;13(1):149-56.

Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T, Miyamoto N, Oki M, Nosho K, Adachi Y, Endo T, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene*. 2005 Nov 24;24(53):7946-52

Thorstensen L, Lind GE, Løvig T, Diep CB, Meling GI, Rognum TO, Lothe RA. Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia*. 2005 Feb;7(2):99-108

Tolwinski NS, Wehrli M, Rives A, Erdeniz N, DiNardo S, Wieschaus E. Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity *Dev Cell*. 2003 Mar;4(3):407-18

Trotman LC, Alimonti A, Scaglioni PP, Koutcher JA, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):523-7. Epub 2006 May 7.

Tsai IC, Woolf M, Neklason DW, Branford WW, Yost HJ, Burt RW, Virshup DM. Disease-associated casein kinase I delta mutation may promote adenomatous polyps formation via a Wnt/beta-catenin independent mechanism. *Int J Cancer*. 2007 Mar 1;120(5):1005-12.

U

Urakami S, Shiina H, Enokida H, Kawakami T, Tokizane T, Ogishima T, Tanaka Y, Li LC, Ribeiro-Filho LA, Terashima M, Kikuno N, Adachi H, Yoneda T, Kishi H, Shigeno K, Konety BR, Igawa M, Dahiya R. Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 15;12(2):383-91.

V

Vinson CR, Conover S, Adler PN. A *Drosophila* tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature*. 1989 Mar 16;338(6212):263-4.

W

Wang SS, Esplin ED, Li JL, Huang L, Gazdar A, Minna J, Evans GA. Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. *Science*. 1998 Oct 9;282(5387):284-7

Wang SS, Virmani A, Gazdar AF, Minna JD, Evans GA. Refined mapping of two regions of loss of heterozygosity on chromosome band 11q23 in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999 Jun;25(2):154-9.

Wang Y, Macke JP, Abella BS, Andreasson K, Worley P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J. A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene *frizzled*. *J Biol Chem*. 1996 Feb 23;271(8):4468-76

Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, Hawkins N. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*. 2001 Jun;48(6):821-9

Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell*. 2002 Apr;1(3):279-88.

Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A, DiNardo S. arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*. 2000 Sep 28;407(6803):527-30

Wiechens N, Fagotto F. CRM1- and Ran-independent nuclear export of beta-catenin. *Curr Biol*. 2001 Jan 9;11(1):18-27

Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev*. 1998 Feb;8(1):95-102.

Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 2003 May 22;423(6938):448-52. Epub 2003 Apr 27

Wipff PJ, Hinz B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. *Eur J Cell Biol.* 2008 Sep;87(8-9):601-15. Epub 2008 Mar 14. Review

Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, Kristiansen G, Hsieh JC, Hofstaedter F, Hartmann A, Knuechel R, Rosenthal A, Pilarsky C. WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol.* 2003 Oct;201(2):204-12.

Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, Shi DL, Zheng J. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell.* 2003

Wong HP, Yu L, Lam EK, Tai EK, Wu WK, Cho CH. Nicotine promotes colon tumor growth and angiogenesis through beta-adrenergic activation. *Toxicol Sci.* 2007 Jun;97(2):279-87. Epub 2007 Mar 16.

Wu B, Crampton SP, Hughes CC. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity.* 2007 Feb;26(2):227-39.

Wu R, Connolly DC, Ren X, Fearon ER, Cho KR. Somatic mutations of the PPP2R1B candidate tumor suppressor gene at chromosome 11q23 are infrequent in ovarian carcinomas. *Neoplasia.* 1999 Oct;1(4):311-4.

Wu W, Glinka A, Delius H, Niehrs C. Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signalling. *Curr Biol.* 2000 Dec 14-28;10(24):1611-4.

Y

Yamamoto H, Kishida S, Kishida M, Ikeda S, Takada S, Kikuchi A. Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *J Biol Chem.* 1999 Apr 16;274(16):10681-4.

Yamamoto H, Hinoi T, Michiue T, Fukui A, Usui H, Janssens V, Van Hoof C, Goris J, Asashima M, Kikuchi A. Inhibition of the Wnt signaling pathway by the PR61 subunit of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*. 2001 Jul 20;276(29):26875-82. Epub 2001 Apr 10.

Yan D, Wallingford JB, Sun TQ, Nelson AM, Sakanaka C, Reinhard C, Harland RM, Fantl WJ, Williams LT. Cell autonomous regulation of multiple Dishevelled-dependent pathways by mammalian Nkd. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 27;98(7):3802-7

Yang GY, Xu KS, Pan ZQ, Zhang ZY, Mi YT, Wang JS, Chen R, Niu J Integrin alpha v beta 6 mediates the potential for colon cancer cells to colonize in and metastasize to the liver. *Cancer Sci*. 2008 May;99(5):879-87. Epub 2008 Feb 18

Yanagawa S, Matsuda Y, Lee JS, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T, Ishimoto A. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J*. 2002 Apr 2;21(7):1733-42.

Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem*. 1996 May 31;271(22):13055-60.

Yeung T.A., Patel B.B, Li X., Seeholzer S.S., Coudry R.A., Cooper H.S., Bellacosa A., Boman B.M., Zhang T., Litwin S., Ross E.A., Conrad P., Crowell J.A., Kopelovich L., Knudson A. One-Hit Effects in Cancer: Altered Proteome of Morphologically Normal Colon Crypts in Familial Adenomatous Polyposis *Cancer Res* 2008; 68: (18).

Ying J, Li H, Yu J, Ng KM, Poon FF, Wong SC, Chan AT, Sung JJ, Tao Q. WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/beta-catenin signaling, and is frequently methylated in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Jan 1;14(1):55-61

Yokoyama N, Malbon CC. Phosphoprotein phosphatase-2A docks to Dishevelled and counterregulates Wnt3a/beta-catenin signaling. *J Mol Signal*. 2007 Oct 25;2:12.

Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2009 Jun;28(1-2):15-33. Review

Z

Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jul 3;92(14):6414-8.

Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, Wynshaw-Boris A, Hsieh JC, He X. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development*. 2008 Jan;135(2):367-75. Epub 2007 Dec 12.

Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*. 2005 Dec 8;438(7069):873-7

Zhang J, Jin X, Fang S, Li Y, Wang R, Guo W, Wang N, Wang Y, Wen D, Wei L, Kuang G, Dong Z. The functional SNP in the matrix metalloproteinase-3 promoter modifies susceptibility and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma but not in gastric cardiac adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 2004 Dec;25(12):2519-24. Epub 2004 Aug 19

Zhao-Yang Z, Ke-Sen X, Qing-Si H, Wei-Bo N, Jia-Yong W, Yue-Tang M, Jin-Shen W, Guo-Qiang W, Guang-Yun Y, Jun N. Signaling and regulatory mechanisms of integrin α v β 6 on the apoptosis of colon cancer cells. *Cancer Lett*. 2008 Aug 8;266(2):209-15. Epub 2008 Apr 1.

Zhou J, Pham HT, Ruediger R, Walter G. Characterization of the A α and A β subunit isoforms of protein phosphatase 2A: differences in expression, subunit interaction, and evolution. *Biochem J*. 2003 Jan 15;369(Pt 2):387-98.

Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004 Jan-Jun;23(1-2):101-17